

**RADIOREZEPTORASSAY FÜR MENSCHLICHES WACHSTUMS-
HORMON UND PROLAKTIN: METHODIK UND KLINISCHE
UNTERSUCHUNGEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

Jochen Schopohl

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548325_0009

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR Dr. E. BUCHBORN

RADIOREZEPTORASSAY FÜR MENSCHLICHES WACHSTUMSHORMON
UND PROLAKTIN: METHODIK UND KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
Jochen Schopohl
aus Amberg

1981

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. v. Werder
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 11. 1981



Meinen Eltern

Ich danke Herrn Professor Dr. P. C. Scriba für die Aufnahme in seine endokrinologische Arbeitsgruppe und Herrn Professor Dr. K. von Werder für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Th. Eversmann, dessen beständiges kritisches Interesse und dessen Hilfe mit Rat und Tat zum Zustandekommen der Arbeit entscheidend beigetragen haben.

Fräulein B. Glöckner, Fräulein M. Attensberger, Frau U. Nitz und Frau G. Urban danke ich für die großzügige Hilfe bei den radioimmunologischen Bestimmungen und bei der Benutzung der Ultrazentrifuge.

Für die kameradschaftliche Zusammenarbeit bei zahlreichen Experimenten danke ich meiner Kommilitonin A. Dietz.

Herrn M. Bauer danke ich für die statistischen Auswertungen und Frau Dr. G. Jäger für die elektronenmikroskopischen Bilder.

Weiterhin gilt mein Dank für die Anfertigung der Abbildungen Frau F. Haag, Frau I. Wiktorin und Herrn L. Bestler.

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. METHODIK</u>	4
2.1. Material	4
2.1.1. Versuchstiere	4
2.1.2. Klinische Untersuchungen	4
2.1.3. Puffer	4
2.1.4. Geräte	5
2.2. Methoden	5
2.2.1. Leber-Präparation	5
2.2.2. Mammapräparation	8
2.2.3. Proteinbestimmung nach Lowry	9
2.2.4. Markierung von hGH und hPRL	11
2.2.4.1. hGH	11
2.2.4.2. hPRL	12
2.2.5. Radiorezeptorassay (RRA)	12
2.2.5.1. Prinzip des RRA	12
2.2.5.2. Durchführung des RRA	12
2.2.5.2.1. Kaninchenleber-RRA (hGH)	13
2.2.5.2.2. Rattenleber-RRA (hPRL)	13
2.2.5.2.3. Kaninchenmamma-RRA (hPRL)	14
2.2.6. hGH bzw. hPRL-RIA	14
2.2.7. Gelchromatographie	14
<u>3. CHARAKTERISIERUNG DES SOMATOTROPHEN UND DES LACTOGENEN REZEPTORS</u>	15
3.1. Somatotropher Rezeptor	15
3.1.1. Morphologie des Rezeptors	15
3.1.2. Vorversuche und Kinetik	16

	Seite
3.1.2.1.	Inkubation im Schüttelwasserbad 16
3.1.2.2.	Einfluß der $MgCl_2$ -Konzentration auf die spezifische Bindung 17
3.1.2.3.	Vergleich von Standardkurven unter unter- schiedlichen Inkubationsbedingungen 18
3.1.2.4.	Zeit und Temperaturkinetik 20
3.1.2.5.	Spezifische Bindung in Abhängigkeit von der Rezeptor-Proteinkonzentration 21
3.1.3.	Sättigung 22
3.1.4.	Spezifität 23
3.1.5.	Dissoziation 24
3.1.6.	Scatchard Plots 25
3.1.7.	RRA-Standardkurve in Puffer und Nullserum 27
3.1.8.	Serumverdünnungskurve 29
3.1.9.	Chromatographische Auftrennung von hGH 30
3.1.10.	Bindungsversuch mit big und little hGH 31
3.1.11.	Qualitätskontrolle 31
3.2.	Laktogene Rezeptoren 32
3.2.1.	Behandlung der Rezeptoren mit hochmolaren $MgCl_2$ -Lösungen 32
3.2.2.	Morphologie der Rezeptoren 33
3.2.3.	Kinetische Untersuchungen 35
3.2.3.1.	Zeit- und Temperaturkinetik 35
3.2.3.2.	Bindungskinetik in Abhängigkeit von der Rezeptor-Proteinkonzentration 37
3.2.4.	Sättigung 40
3.2.5.	Kreuzreaktivität 42
3.2.5.1.	Interferenz mit anderen lactogenen Hormonen 42
3.2.5.2.	Interferenz mit Serumproteinen 44
3.2.6.	Dissoziation 45
3.2.7.	Scatchard-Plot 48

	Seite
3.2.8. Nullserum- und Pufferkurven	49
3.2.9. Serumverdünnungskurven	52
3.2.10. Chromatographische Auftrennung von Prolaktin	53
3.2.11. Qualitätskontrolle	56
<u>4. ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN</u>	57
4.1. Klinische Ergebnisse bei Akromegalie	57
4.1.1. Akromegale prä- und postoperativ	57
4.1.2. Akromegale vor und nach Bestrahlung	59
4.1.3. Akromegale unter Therapie mit Bromocriptin	59
4.1.3.1. Verlauf unter Dauertherapie mit Bromocriptin	59
4.1.3.2. Verlauf unter akuter Belastung mit Bromocriptin	61
4.1.4. SRIF-Tests	63
4.2. Klinische Ergebnisse bei Hyperprolaktinämie	65
4.2.1. Korrelation zwischen RIA und Kaninchen-mamma-RRA	65
4.2.2. Korrelation zwischen RIA und Rattenleber-RRA	66
4.2.3. RIA/RRA-Quotient für beide Radiorezeptorassays	67
<u>5. DISKUSSION</u>	68
5.1. Methodik im Vergleich mit der Literatur	69
5.1.1. hGH-Radiorezeptorassay	69
5.1.1.1. Zeit- und Temperaturkinetik	69
5.1.1.2. Sättigung	69
5.1.1.3. Spezifität	70

	Seite
5.1.1.4. Reversibilität	70
5.1.1.5. Affinität	70
5.1.2. PRL-Radiorezeptorassays	71
5.2. Klinische Ergebnisse	73
5.2.1. Akromegalie	73
5.2.2. Hyperprolaktinämie	75
 6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	 76
 7. <u>SUMMARY</u>	 78
 8. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	 79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

hGH	human growth hormone
hPRL	human prolactin
hPL	human placenta lactogen
oPRL	ovine prolactin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
PTH	Parathormon
BC	Bromocriptin (Pravidel ^R); CB 154
RIA	Radioimmunoassay
RRA	Radiorezeptorassay
M	molar
fM	femtomol
mM	millimolar
(w/v)	Gewicht/Volumen
rpm	Umdrehungen pro Minute
B	spezifische Bindung
n	unspezifische Bindung
K _a	Assoziationskonstante
B _{1,2}	Bindungsstellen

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Seite

Abb. 1:	Elektronenmikroskopisches Bild der Kaninchenlebermembranen	16
Abb. 2:	Vergleich von hGH-Standardkurven	19
Abb. 3:	Zeit- und Temperaturkinetik des hGH-RRA	20
Abb. 4:	Proteinkinetik des hGH-RRA	21
Abb. 5:	Sättigung des hGH-RRA	22
Abb. 6:	Kreuzreaktivität des hGH-RRA	23
Abb. 7:	Dissoziation des hGH-RRA	24
Abb. 8:	Standardkurven des hGH-RRA in Puffer und Nullserum	28
Abb. 9:	hGH-RRA: Serum- und hGH-Standard-verdünnungskurven	29
Abb. 10:	Chromatographisches Elutionsprofil einer hypophysären hGH-Präparation bestimmt im RIA und RRA	30
Abb. 11:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Kaninchenmammapräparation	33
Abb. 12:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Rattenleberpräparation	34
Abb. 13:	Zeit- und Temperaturkinetik der Prolaktinbindung an Kaninchenmammarzeptoren	35
Abb. 14:	Zeit- und Temperaturkinetik der Prolaktinbindung an Rattenleberrezeptoren	36
Abb. 15:	Kinetik der Prolaktinbindung an Kaninchenmamamembranen bei unterschiedlicher Proteinkonzentration	38

Abb. 16:	Kinetik der Prolaktinbindung an Rattenlebermembranen bei unterschiedlicher Rezeptor-Proteinkonzentration	39
Abb. 17:	Maximale Prolaktinbindung an Kaninchenmammmembranen	40
Abb. 18:	Maximale Prolaktinbindung an Rattenlebermembranen	41
Abb. 19:	Kreuzreaktivität der Bindung von hGH, hPL und oPRL mit hPL an Kaninchenmammmembranen	42
Abb. 20:	Kreuzreaktivität der Bindung von hGH und hPL mit hPRL an Rattenlebermembranen	43
Abb. 21:	Interferenz verschiedener Serumproteine mit der Prolaktinbindung an Kaninchenmammmembranen	44
Abb. 22:	Abdissoziation von ^{125}J -hPRL von Kaninchenmammmembranen bei unterschiedlicher Temperatur bzw. mit Magnesiumchloridpuffer	46
Abb. 23:	Abdissoziation von ^{125}J -hPRL von Rattenlebermembranen bei unterschiedlicher Temperatur bzw. mit Magnesiumchloridpuffer	47
Abb. 24:	Die PRL-Standardkurve mit Puffer und Nullserum (Rattenlebermembranen)	50
Abb. 25:	PRL-Standardkurven mit Puffer und Nullserum (Rattenlebermembranen)	51
Abb. 26:	Kaninchenmamma-RRR: Serumverdünnungskurven	52
Abb. 27:	Rattenleber-RRR: Serumverdünnungskurven	53
Abb. 28:	Serumchromatographie eines Patienten mit Prolaktin bildendem Hypophysentumor (Kaninchenmamma-RRR)	54
Abb. 29:	Serumchromatographie eines Patienten mit Prolaktin bildendem Hypophysentumor (Rattenleber-RRR)	55

TABELLENVERZEICHNIS

Seite

Tab. 1:	Spezifische Bindung von hGH an Kaninchenlebermembranen mit und ohne Schüttelwasserbad	17
Tab. 2:	Einfluß der $MgCl_2$ -Konzentration auf die hGH-Bindung an Kaninchenlebermembranen	18
Tab. 3:	Vergleich von hGH-Standardkurven	19
Tab. 4a:	Unterschiede zwischen den Standardkurven für die Scatchard Plots	25
Tab. 4b:	Ergebnisse der Scatchard Plots	26
Tab. 5:	hGH-Standardkurve in Puffer und Nullserum	27
Tab. 6:	Serum- und hGH-Standardverdünnungskurven	29
Tab. 7:	Bindungsversuch mit big und little hGH	31
Tab. 8:	Behandlung der PRL Rezeptoren mit hoch-molaren $MgCl_2$ Lösungen	32
Tab. 9:	Abdissoziation von ^{125}J -hPRL in Abhängigkeit von $MgCl_2$ Konzentration, Temperatur und Zeit	45
Tab. 10a:	Scatchard Plots vom Kaninchenmamma-RRR	48
Tab. 10b:	Scatchard Plots vom Rattenleber-RRR	49
Tab. 11:	hGH-RIA und RRR-Spiegel bei 24 Patienten mit aktiver Akromegalie vor und nach Hypophysenoperation	58
Tab. 12:	hGH-RIA und RRR-Spiegel bei 10 Patienten mit aktiver Akromegalie vor und unter Langzeitbehandlung mit Bromocriptin	60
Tab. 13:	Akuter Verlauf der hGH-RIA und RRR-Spiegel nach Gabe von 2,5 mg Bromocriptin	62
Tab. 14:	hGH-RIA und RRR-Spiegel beim SRIF Test	64
Tab. 15:	RIA/RRR Quotienten für den Kaninchenmamma- bzw. Rattenleber-RRR	67

1. EINLEITUNG

Höher- und niedermolekulare Formen von Peptidhormonen, z.B. Gastrin, Insulin, ACTH, Glucagon, PTH, hGH und hPRL, konnten im Serum und in Gewebsextrakten nachgewiesen werden (3, 6, 30, 31, 71, 73, 89, 97, 98, 106, 107). Die höhermolekularen Formen haben z.B. bei Insulin, PTH und ACTH die Funktion von Prohormonen, d. h. inaktiven Vorstufen der biologisch aktiven Form. Sie kommen andererseits bei humanem Wachstumshormon oder Prolaktin als dimere oder polymere Formen (big-big, big und little) vor, deren Funktion nicht geklärt ist (3, 7, 31, 73, 97, 103).

Untersuchungen zur Heterogenität von hGH zeigten zwar ein unterschiedliches Verteilungsmuster der einzelnen Formen bei akromegalischen Patienten im Vergleich zu Normalpersonen (34, 35, 36), eine Korrelation mit der klinischen Aktivität der Akromegalie ließ sich jedoch nicht nachweisen (30, 103). Auch zeigte es sich, daß die Höhe der radioimmunologisch meßbaren hGH-Spiegel in keiner Korrelation zur Ausprägung der klinischen Symptome, d. h. dem Ausmaß der Akrenvergrößerung, Visceromegalie, Arthropathie, Kopfschmerzen und metabolischen Veränderungen stand (13, 15, 61). Die Besserung der klinischen Aktivität durch Operation (19, 40, 54), Bestrahlung (42, 51, 78) oder medikamentöser Behandlung (12, 55, 88, 90, 92, 95) zeigte in vielen Fällen keine Korrelation zur Höhe der radioimmunologisch meßbaren hGH-Spiegel (43, 90, 96).

Das Krankheitsbild der Hyperprolaktinämie äußert sich bei der Frau in Regelstörungen und Galaktorrhoe, beim Mann in Libido- und Potenzverlust sowie Hypogonadismus (96,99,100).

Im Gegensatz zur Akromegalie korreliert die Tumorgröße mit der Ausprägung der klinischen Aktivität und den radioimmunologisch gemessenen hPRL-Serumspiegeln relativ gut (18, 99).

Die Therapie besteht wie bei der Akromegalie in Operation, Bestrahlung und/oder medikamentöser Behandlung. Die klinische Besserung bzw. der Abfall der radioimmunologisch meßbaren hPRL-Spiegel zeigen im Gegensatz zur Akromegalie keine Diskrepanzen (99).

Bei den einzelnen Bestimmungsmethoden für hGH und hPRL unterscheidet man zwischen der Immunoaktivität (105), die mit dem RIA gemessen wird, und der biologischen Aktivität, die mit dem Bioassay erfaßt wird (24, 37, 74). Der Radio-receptorassay steht bezüglich Immuno- und Bioaktivität zwischen den beiden genannten Methoden (76).

Der RRA wurde entwickelt, da sich Technik, Qualität und Aufwand des Bioassays als unbefriedigend erwiesen. Für den Aufbau des RRA wurden aus den jeweiligen Zielorganen isolierte Rezeptoren verwendet (75, 76). Als Zielorgan für das hGH bot sich insbesondere die Leber an, da hier Somatomedine gebildet werden, die einen Teil der peripheren hGH-Wirkungen vermitteln (46, 77, 93, 104). Ein weiteres Zielorgan für hGH stellen die Lymphozyten dar, deren Zellmembranen Rezeptoren für hGH und andere Hormone aufweisen (27, 28, 33, 53, 68, 79).

Das Zielorgan von PRL ist die Mamma, wobei aber auch in anderen Organen, wie Ovar, Nebenniere, Niere, Samenbläschen, Prostata, Hoden, Uterus und Leber PRL-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (1, 4, 25, 58, 65, 81, 85, 86).

Die im RRA bestimmten hGH- bzw. hPRL-Spiegel zeigten gute Übereinstimmung mit den radioimmunologisch gemessenen (38, 43, 86, 93), entsprechend der höheren biologischen Spezifität des RRA besteht jedoch eine bessere Korrelation zu den im Bioassay bestimmten Werten (23, 36, 43, 76, 93).

Die höher- und niedermolekularen Formen von hGH bzw. hPRL weisen gleiche Immunoaktivität auf (21, 26, 30, 96), erhebliche Unterschiede ergaben sich jedoch für die im RIA und RRA bestimmten Werte, die höhermolekularen Formen zeigten eine deutlich niedrigere Rezeptoraktivität entsprechend der niedrigeren Aktivität im Bioassay (2, 21, 32, 33, 36, 43).

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die Diskrepanz zwischen der Immuno- und Rezeptoraktivität von hGH und hPRL bezüglich der molekularen Heterogenität genauer zu untersuchen und am Beispiel der Akromegalie bzw. Hyperprolaktinämie deren klinische Bedeutung zu erforschen.

Dazu war es erforderlich, aus den jeweiligen Zielorganen spezifische Rezeptoren zu isolieren und damit spezifische RRA's aufzubauen. Die Untersuchung der molekularen Heterogenität sollte mit gelchromatographischer Auftrennung der einzelnen Formen erfolgen. Der klinischen Bedeutung sollte durch die Untersuchung von Patientenserum mit hGH oder hPRL-bildenden Hypophysentumoren vor und nach Therapie, d.h.

1. vor und nach Operation
 2. vor und nach Bestrahlung
 3. vor und nach medikamentöser Therapie
(akut und chronisch)
- nachgegangen werden.

2. METHODIK

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere

Zur hGH-Rezeptorisolierung wurden Lebern von weiblichen Neuseeländerkaninchen verwendet. Die Tiere wurden zwischen dem 27. und 30. Schwangerschaftstag dekapitiert und die Leber entnommen. Das durchschnittliche Gewicht der Kaninchen betrug etwa 3 kg.

Die Prolaktinrezeptoren wurden aus der Mamma trächtiger Neuseeländerkaninchen bzw. aus den Lebern trächtiger Sprague-Dawley-Ratten gewonnen. Die trächtigen Sprague-Dawley-Ratten (durchschnittliches Gewicht 200 bis 300 g) wurden zwischen dem 12. und 14. Tag der Schwangerschaft dekapitiert und die Leber entnommen.

2.1.2. Klinische Untersuchungen

Messungen im Serum wurden mit Proben von Patienten mit hGH bzw. PRL produzierenden Hypophysentumoren durchgeführt.

2.1.3. Puffer

Leberspülpuffer (0,025 M Tris HCl, 0,3 M Saccharose, pH 7,6)
Homogenisierungspuffer (0,01 M Hepes, 0,25 M Saccharose, 0,02 % NaN_3 , pH 7,5)
Zentrifugationspuffer (0,01 M Hepes, 0,25 M Saccharose, 0,001 M MgCl_2 , 0,02 % NaN_3 , pH 7,5)
Assaypuffer (0,025 M Tris-HCl, 0,01 bzw. 0,001 M MgCl_2 , pH 7,6)

Homogenisierungspuffer (Mamma) (0,02 M Tris-HCl, 0,25 M Saccharose, pH 7,4)

MgCl₂ Waschpuffer (0,025 M Tris-HCl, 0,5 - 1,5 M MgCl₂, pH 7,6).

2.1.4. Geräte

Homogenisator (Firma Braun)

Ultra-Turrax (Firma Janke & Kunkel KG)

Waring Comercial Blendor (Firma Waring Comercial Division)

Refractometer (Firma Zeiss)

Gradientenformer (Firma Cenco)

Biotronic-Kühlzentrifuge (IEC PR 6000)

Ultrazentrifuge (Firma Beckman L 50)

Schüttelwasserbad (Firma Kottermann)

γ-Counter (Firma Kontron)

2.2. Methoden

2.2.1. Leber-Präparation

Die Lebern von Kaninchen bzw. Ratten wurden nach der gleichen Vorschrift präpariert. Nachdem die Tiere dekapitiert worden waren, wurde sofort die Leber herausgenommen und auf Eis gelegt, alle weiteren Präparationsschritte fanden bei 4°C im Kühlraum statt.

Von den Kaninchenlebern wurde zunächst die Gallenblase abpräpariert, die Lebervenen wurden von der Pfortader aus kanüliert und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung ausgewaschen, bis sich die Lebern weißlich färbten, danach wurde mit Spülpuffer nachgespült.

Nach dem Waschen wurde das Leberfeuchtgewicht bestimmt, es betrug bei den Kaninchenlebern 90 bis 120 g und bei den Rattenlebern 15 bis 20 g.

Nun wurden die Lebern in ca. 5 g große Stückchen zerschnitten und im fünffachen Volumen (w/v) Homogenisationspuffer mit dem Waring Comercial Blendor bei langsamer Geschwindigkeit (10 sec) gemixt. Das so gewonnene Homogenat wurde mit Teflonpotttern im Homogenizer zuerst bei 66 μm , dann bei 32 μm Clearance mit 1000 rpm jeweils 10 sec homogenisiert. Danach wurde das Homogenat sorgfältig durch vier Lagen Gaze filtriert und auf das Zehnfache des Leberfeuchtgewichts mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt. Nun wurde das Homogenat dreimal jeweils 15 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert, wobei jeweils das Pellet nachgewaschen wurde, der Überstand wurde verworfen. Nach der dritten Zentrifugation wurde das vorgereinigte Pellet mit dem doppelten Volumen des Leberfeuchtgewichts mit Zentrifugationspuffer vermischt und gepottert. Dieses Homogenat wurde nun in ca. 20 ml Fraktionen bei -20°C eingefroren.

Jeweils eine oder zwei der oben genannten 20 ml Fraktionen wurden am Tag ihrer Weiterverarbeitung aufgetaut und mit einer 70 %igen Saccharoselösung so lange versetzt, bis eine 48 %ige Saccharose-Homogenat-Lösung erreicht war. Dies konnte an dem Brechungsindex von 1,425 auf dem Refraktometer abgelesen werden. Zur Herstellung dieser Lösung wurde jeweils mit dem Braun-Homogenizer bei 66 μm Clearance bei 1000 rpm 5 bis 10 sec gepottert und dann mit dem Refraktometer die Dichte bestimmt, bis der gewünschte Brechungsindex von 1,425 erreicht worden war. Diese 48 %ige Homogenatsuspension konnte nun für die Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt werden. Dazu wurde in ein 40 ml fassendes Poly-

carbonatröhrchen auf den Boden 6 ml der 48 %igen Homogenatsuspension eingefüllt und danach mit Hilfe eines Gradientenformers 11 ml einer 45 %igen, dann einer 41 %igen und zuletzt einer 35 %igen Saccharoselösung darübergeschichtet. Mit Hilfe des Gradientenformers konnten jeweils sechs Gradientenröhrchen gleichzeitig beschichtet werden.

Nach ihrer Fertigstellung wurden die Gradientenröhrchen genau austariert, in die Rotorgefäße eines SW 27 Rotors eingehängt und in der Ultrazentrifuge bei 22.500 rpm zentrifugiert (120 min, ohne Auslaufbremse). Die für den RRA verwendete Membranfraktion reicherte sich zwischen der 41 und 35 %igen Saccharoselösung an und wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, gesammelt und bei -80°C eingefroren. Diese von einer Leberpräparation gesammelten Schichten wurden im Verhältnis 1:2 mit Assaypuffer verdünnt und in Polycarbonatröhrchen bei 35.000 rpm zentrifugiert (Rotor Ti 35, 75 min). Der Überstand wurde verworfen, die damit von der Saccharose gereinigten Pellets in ca. 0,5 ml Assaypuffer gelöst, mit einem Braun-Homogenizer gepottert und in etwa 4 ml Fraktionen bei -20°C eingefroren. Die eingefrorenen Membranen konnten circa bis zu zwei Jahren so aufbewahrt werden, ohne daß es zu einem wesentlichen Abfall der spezifischen Bindung kam. Da jedoch die Membranausbeute zwischen den einzelnen Lebern teilweise erheblich schwankte, wurden die gesammelten Schichten aus den ersten Gradienten sofort abzentrifugiert und ein Bindungsversuch unternommen, um nur Leberpräparationen mit für den RRA ausreichender spezifischer Bindung zu verwenden. Aufgrund der Membranausbeute mußten bei der Rattenleberpräparation immer vier bis acht Ratten-

lebern gepoolt werden. Der einzige Unterschied im Präparationsvorgang zu der Keninchenleberpräparation bestand in der Nachwaschung der Rezeptorpräparation mit 1 M MgCl_2 -Puffer, wodurch die spezifischen Bindungen der Rattenlebermembranen wesentlich erhöht werden konnten.

2.2.2. Mammapräparation

Entsprechend den Literaturangaben wurden die Kaninchen zunächst vorbehandelt, d. h. die Kaninchen wurden vom 15. bis 19. Schwangerschaftstag über vier Tage mit 10 mg Hydrocortison und 2 mg hGH täglich geprimt und dann erst die Mamma entnommen. Einige Kaninchen wurden dreimal alle 12 Stunden jeweils mit 2,5 mg Bromocriptin (s.c.) vorbehandelt. Die präparierte Mamma wurde in eiskalter 0,3 M Saccharoselösung von Fett und Muskelgewebe befreit und dann das Feuchtgewicht bestimmt. Um die Mamma dann in dünne Scheibchen schneiden zu können, wurde sie kurzzeitig bei -80°C eingefroren. Die zerkleinerte Mamma wurde in fünffachem Volumen (w/v) Homogenisierungspuffer 2 mal 30 sec mit dem Ultraturrax bei mittlerer Drehzahl gemixt, das entstandene Homogenat mit dem Homogenizer mit 66 bzw. 32 μm Clearance gepottert und anschließend durch eine vierfach gelegte Gaze gefiltert. Das Homogenat wurde dann bei 1500 rpm über 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Pellet verworfen. Der Überstand wurde weiterzentrifugiert bei 13.500 rpm (Rotor Ti 35, 30 min), das dabei entstandene Pellet wurde wieder verworfen, der Überstand wurde weiterzentrifugiert bei 35.000 rpm (90 min). Dieser letzte Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 M MgCl_2 Waschpuffer nachgewaschen, nochmals mit einem Glashomogenizer gepottert und erneut

mit 35.000 rpm (90 min) abzentrifugiert. Diese Pellets wurden dann in MgCl_2 -freiem Puffer gelöst, gepottert und erneut bei 35.000 rpm (90 min) abzentrifugiert. Diese damit von Saccharose bzw. Magnesiumchlorid gereinigten Membranen wurden jeweils in 2 bis 3 ml Assaypuffer gelöst, gesammelt und mit Glashomogenizer gepottert. Die so gewonnene Rezeptorlösung wurde dann in 4 ml Fraktionen bei -20°C eingefroren. Auch diese Rezeptoren hatten nach etwa zweijähriger Lagerung nur gering an spezifischer Bindungsfähigkeit eingebüßt.

2.2.3. Proteinbestimmung nach Lowry (56)

Für die Proteinbestimmung wurden 0,2 ml der Rezeptorlösung verwendet, die für die Bestimmung notwendigen Reagenzien bestanden in:

Lösung A: 2 g% Na_2CO_3

Lösung B: 0,5 g% CuSO_4 und 1,5 g% K-Na Tartrat im Verhältnis 1:1 gemischt

Lösung C: 49 ml von Lösung A
1 ml von Lösung B
2,5 ml 10 %ige SDS-Lösung sorgfältig gemischt

Lösung D: Folin Reagenz 1:2 mit H_2O verdünnt

Lösung E: Ausgangslösung für die Eichkurve, sie enthält 4 mg/ml Albumin in Assaypuffer gelöst. Aus ihr wird eine Verdünnungsreihe mit verschiedenen Albuminkonzentrationen hergestellt (4 - 3 - 2 - 1 - 0,5 mg/ml).

Durchführung der Proteinbestimmung:

1. Die Eichwerte (4-fach-Werte) enthalten 1 ml von Lösung C und 50 μ l der jeweiligen Albuminstandardlösung.
2. Die Probenwerte (3-fach-Werte) enthalten 1 ml von Lösung C und 50 μ l der jeweiligen Probenverdünnung, von der Rezeptorlösung wurden 2 Verdünnungen (1:10 und 1:20) eingesetzt.
3. Die Blindwerte (3-fach-Werte) enthalten 1 ml von Lösung C und 50 μ l H₂O.
Die Zugabe der 50 μ l Standard-, Probenlösung und H₂O muß dabei in gleichen Zeitabständen erfolgen (10 - 15 sec Intervall). Alle Proben wurden nach Zugabe der 50 μ l 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert.
4. Dann folgt im gleichen Zeitabstand und Reihenfolge die Zugabe von 100 μ l von Lösung D unter Schütteln der einzelnen Proben, die dann 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert werden.
5. Mit dem Photometer wurde die Extinktion aller Proben bei 578 nm bestimmt.
6. Die Eichkurve wird auf Millimeterpapier aufgetragen, von der dann mit der gemessenen Extinktion der Proben die Proteinkonzentration der Rezeptorlösung abgelesen werden kann.

2.2.4. Markierung von hGH und hPRL

2.2.4.1. hGH

Die Markierung wurde nach der Lactoperoxidasemethode (72, 91) durchgeführt. Die dazu verwandten Reagenzien waren ein 0,5 M PO_4 -Puffer, pH 7,6 sowie ein Markierungspuffer (0,05 M PO_4 , 0,02 %iger NaN_3 , pH 7,6) sowie eine Stop-Lösung (16 %iger Saccharose, 1 %iges K-Jodid, 0,02 %ige NaN_3 , jeweils w/v) sowie H_2O_2 (1:15 bis 1:30.000 verdünnt). Die Lactoperoxidase (Fa. Calbiochem) wurde in 0,1 M Na-Acetatpuffer, pH 5,6 gelöst und fraktioniert in silikonisierten Gefäßen eingefroren. Der hGH-Markierungsstandard stammte von der Firma Kabi AB in Stockholm. Zur Trennung von freiem Jod und markiertem Hormon wurde eine Sephadex G-50 Säule verwandt (1 x 15 cm).

Für die Markierung wurden in ein silikonisiertes Reagenzglas 20 μl 125/J (1 mCi) gegeben, die Gesamtaktivität bestimmt und darauf der Markierungsstandard (50 μl hGH) 10 μl LPO sowie 2 x 1 μl H_2O_2 im Abstand von 15 sec zugegeben. Die Markierung wurde mit 100 μl Stop-Lösung beendet und das Reaktionsgemisch sofort mit einer Pasteurpipette auf die Sephadex G-50 Säule aufgetragen. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler in 1 ml Fraktionen aufgefangen, von dem Proteinpeak wurde der abfallende Schenkel verwendet. Das so vorgereinigte, markierte Hormon wurde dann über eine Sephadex G-75 Säule (3 x 100 cm) rechromatographiert, um die little Fraktion von big bzw. damaged Anteilen zu reinigen.

2.2.4.2. hPRL

Die Prolactinmarkierung erfolgte nach der gleichen Vorschrift.

2.2.5. Radiorezeptorassay (RRA)

2.2.5.1. Prinzip des RRA

Um einen Rezeptor konkurrieren kompetitiv radioaktiv markiertes und unmarkiertes Hormon. Der Anteil an radioaktivem gebundenem Hormon nimmt mit steigender Menge an unmarkiertem Hormon ab, auf diese Weise kann mit Hilfe einer Markierungsreihe aus einer bekannten Standardkonzentration eine Eichkurve (57) erstellt werden, an der unbekannte Proben abgelesen werden können.

2.2.5.2. Durchführung des RRA

Allgemeines Ansatzschema:

	Puffer	Tracer	Standard	Serum	Rezeptor	Nullserum	Gesamt- volumen
B ₀	100 µl	100 µl	-	-	100 µl	100 µl	400 µl
Standard	-	100 µl	100 µl	-	100 µl	100 µl	400 µl
Probe	100 µl	100 µl		100 µl	100 µl		400 µl
N		100 µl	100 µl		100 µl	100 µl	400 µl
GA		100 µl					

B₀: Unter B₀ ist die Gesamtbindung von radioaktivem Hormon zu verstehen, unter

N die sogenannte unspezifische Bindung, d.h. diejenige Bindung, die nach Zugabe von kaltem Hormon im Überschuß zu messen ist.

Als Nullserum wurden Seren von hypophysectomierten Patienten verwendet, bei denen radioimmunologisch kein hGH nachweisbar war bzw. der PRL-Spiegel unter 40 µE/ml lag.

2.2.5.2.1. Kaninchenleber-RRA (hGH)

Beim Ansatz wurde zuerst Puffer bzw. Nullserum, dann Standardlösung und zuletzt Rezeptorsuspension zugegeben. Nun wurde 30 min "kalt" vorinkubiert und danach 3 Std mit Tracer "heiß" inkubiert.

Der Rezeptor wurde in einer Proteinkonzentration von ca. 2 mg/ml eingesetzt. Bevor die Rezeptorsuspension zugegeben wurde, wurde sie nochmals gepottert. Die Vorinkubation (30 min) und die Inkubation (3 Std) wurden bei 30°C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem zu jeder Probe 1 ml eiskalter 0,5 %iger Albuminpuffer zugegeben wurde. Alle Proben wurden dann 30 bis 45 min bei 4000 Umdrehungen (4°C) zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Alle Proben wurden als 3-fach-Werte angesetzt, B₀-Werte und Kontrollen jeweils als 6-fach-Werte. Als Kontrollen wurden in jedem Assay mindestens zwei Seren mit unterschiedlich hohen Wachstumshormonspiegeln, gemessen im Radioimmunoassay, eingesetzt. Die Verdünnungen der Standardkurve betrugen 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 62,5 - 125 - 250 - 500 - 1000 - 2000 ng/ml. Der 50% Intercept schwankte zwischen 30 und 50 ng/ml, die untere Nachweisgrenze lag zwischen 2 und 10 ng/ml. Die Gesamtbindung betrug 15 - 20 %, die unspezifische Bindung 2 - 3 % (siehe Abb. 2, S. 19).

2.2.5.2.2. Rattenleber-RRA (hPRL)

Das Assayschema war das gleiche wie bei dem Kaninchenleber-RRA, jedoch ohne Vorinkubation. Die Proteinkonzentration der Rezeptorsuspension lag bei etwa 2 - 3 mg/ml. Die spezifische Bindung betrug 5 - 7 %, der 50% Intercept schwankte zwischen 500 und 1200 µE/ml, die untere Nachweisgrenze zwischen 100 und 200 µ E/ml (hPRL) (siehe Abb. 20, S. 43).

2.2.5.2.3. Kaninchenmamma-RRA (hPRL)

Auch dieser Assay wurde nach dem gleichen Schema wie der Rattenleber- und Kaninchenleberassay durchgeführt, auch ohne Vorinkubation. Die eingesetzte Rezeptorproteinkonzentration lag zwischen 2 und 5 mg/ml. Die spezifische Bindung schwankte zwischen 7 und 12 %. Der 50% Intercept und die untere Nachweisgrenze entsprachen den beim Rattenleber-RRA gefundenen Werten. Sowohl beim Rattenleber- wie Kaninchenmamma-RRA wurden dieselben Standards verwendet, sie wurden aus Patientenseren mit massiv erhöhten Prolactinspiegeln, jedoch ohne meßbares Wachstumshormon, verdünnt. Die Standardkurve bestand aus folgenden Verdünnungen: 125 - 250 - 500 - 1000 - 2000 - 4000 - 10.000 μ E/ml (hPRL) (siehe Abb. 19 S. 42).

2.2.6. hGH bzw. hPRL-RIA

Beide radiomimmunologischen Bestimmungsmethoden wurden nach dem Doppelantikörperverfahren durchgeführt (22, 96).

2.2.7. Gelchromatographie

Zur Auftrennung von big und little Hormonformen wurden Seren von Patienten mit Prolactin- bzw. hGH-produzierenden Hypophysentumoren sowie eine hypophysäre hGH-Präparation (Gorm, Fa. Serono) über eine Sephadex G-75 Säule (3 x 100 cm) chromatographiert. Die Säule wurde mit Dextran Blau geeicht und mit 10 %iger Albuminlösung abgesättigt. Bei den Serumchromatographien wurden jeweils 2 ml Serum (hPRL 500.000 - 700.000 μ E/ml; hGH 0,5 mg/ml) aufgetragen, das Eluat wurde in 10 ml-Fractionen gesammelt und sowohl im RIA wie RRA bestimmt.

3. CHARAKTERISIERUNG DES SOMATOTROPHEN UND DES LACTOGENEN REZEPTORS

3.1. Somatotropher Rezeptor

Nach Cuatrecasas (14) ist ein Rezeptor durch folgende Eigenschaften definiert.

1. Strukturelle und sterische Spezifität des Rezeptors
2. Sättigbarkeit des Rezeptors als Hinweis für eine endliche Begrenzung der Bindungsstellen
3. Spezifität des Rezeptors bezogen auf die Gewebsspezifität in Übereinstimmung mit der biologischen Sensitivität der Zielorgane
4. Reversibilität der Bindung
5. Hohe Affinität des Rezeptors in Übereinstimmung mit physiologischen Konzentrationen des Hormons

3.1.1. Morphologie des Rezeptors

Wie aus der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb.1) hervorgeht, handelt es sich bei dem Kaninchenleberrezeptor um hochgereinigte Leberzellenmembranen, die nur noch von geringen Resten endoplasmatischen Reticulums verunreinigt sind.

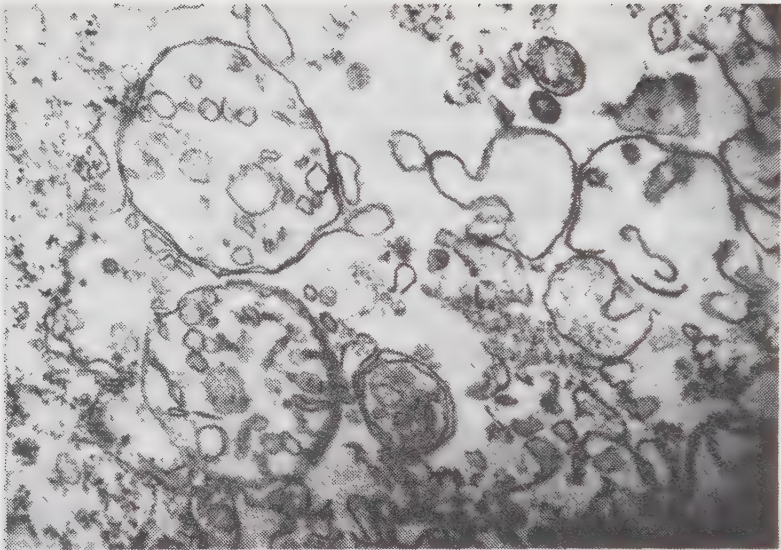


Abb. 1: Elektronenmikroskopisches Bild der Kaninchenleberzellmembranen (1:30.000), ermöglicht durch die freundliche Mitarbeit von Frau Dr. Jäger (Institut für Haematologie der Gesellschaft für Strahlenforschung, Landwehrstraße 61, 8000 München 2)

3.1.2. Vorversuche und Kinetik

Zunächst zeigte sich, daß zur Standardisierung der Versuchsbedingungen eine möglichst gleichmäßige Durchmischung der Rezeptorsuspension mit dem Inkubationsmedium Voraussetzung war. Dazu war notwendig

3.1.2.1. Inkubation im Schüttelwasserbad

Verglichen wurden spezifische Bindung bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen jeweils mit oder ohne Schüttelwasserbadinkubation.

Tab. 1: Ohne Schüttelwasserbad

Proteinkonzentration	6,8	3,4	1,7	0,85	0,42 (mg/ml)
Spezifische Bindung	18,9	10	6,4	4,6	2,3 (%)

Mit Schüttelwasserbad

Proteinkonzentration	6,8	1,7	0,85	0,42	(mg/ml)
Spezifische Bindung	25	14,8	9,4	5,4	(%)

Beide Versuche wurden mit derselben Rezeptorpräparation durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, daß mit dem Schüttelwasserbad schon mit der Hälfte der eingesetzten Rezeptorproteinkonzentration die gleiche spezifische Bindung erreicht wird im Vergleich zur Bindung ohne Schüttelwasserbad.

3.1.2.2. Einfluß der $MgCl_2$ -Konzentration
auf die spezifische Bindung

Zur Untersuchung der Frage, ob die spezifische Bindung durch 1 oder 10 mM $MgCl_2$ -Konzentration im Assaypuffer verändert würde, wurde ein Bindungsversuch mit zwei Rezeptorpräparationen bei jeweils unterschiedlicher $MgCl_2$ -Konzentration durchgeführt (Tab. 2).

Tab. 2.

	MgCl ₂ -Kon- zentration	Gesamt- bindung	unspez. Bindung	spezif. Bindung
Präparation I	1mM MgCl ₂	17,4 %	3,5 %	13,9 %
	10mM MgCl ₂	24,5 %	3,7 %	20,8 %
Präparation II	1 mM MgCl ₂	17,9 %	3 %	14,9 %
	10mM MgCl ₂	25,1 %	3,7 %	21,4 %

Die spezifische Bindung konnte durch die höhere Magnesiumchloridkonzentration um etwa ein Drittel verbessert werden.

3.1.2.3. Vergleich von Standardkurven unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Die einzelnen Standardkurven (I - IV) wurden folgendermaßen angesetzt:

Kurve I	ohne Vorinkubation und ohne Schüttelwasserbad
Kurve II	ohne Vorinkubation jedoch mit Schüttelwasserbad
Kurve III	mit Vorinkubation und Schüttelwasserbad sowie
Kurve IV	mit Vorinkubation und Schüttelwasserbad sowie zusätzlich chromatographisch gereinigtem hGH- Standard (Tab. 3, Abb. 2).

Tab. 3:

	Untere Nach- weisgrenze (ng/ml)	spezif. Bindung (%)	Protein- konzentration (mg/ml)
Kurve I	32	17,1	6,8
Kurve II	10,7	9,8	2,1
Kurve III	8	9,5	2,5
Kurve IV	4,2	19,9	2,5

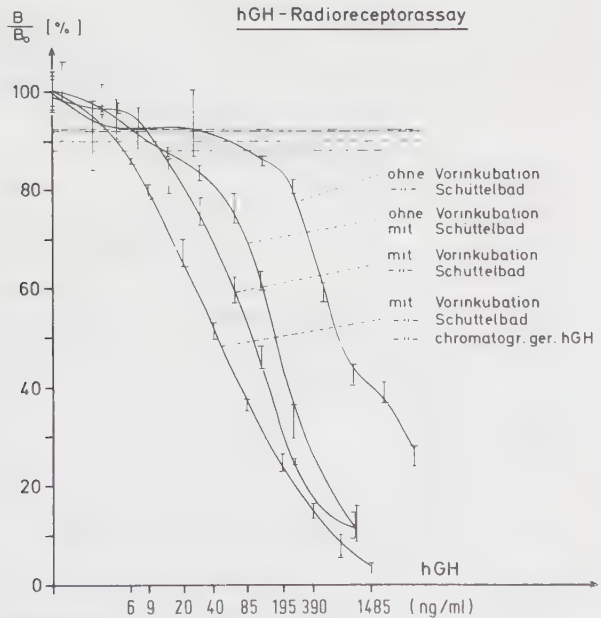


Abb. 2: Vergleich von hGH-Standardkurven (Kaninchenleber-RRA) unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen
(Die waagerechten gestrichelten Linien stellen die untere Nachweisgrenze $B_0 - 3s$ dar).

Durch die nacheinander eingeführten Verbesserungen konnte die Standardkurve wesentlich empfindlicher gemacht werden. Unterschiedliche Angaben bezüglich der Rezeptorkonzentrationen beruhen darauf, daß unterschiedliche Rezeptorpräparationen verwendet werden mußten.

3.1.2.4. Zeit und Temperaturkinetik

Zur Bestimmung der optimalen Zeit bzw. Temperatur wurde die spezifische Bindung bei drei verschiedenen Temperaturen (25, 30, 37°C) über 30 - 60 - 120 und 180 Minuten untersucht. Die Rezeptorproteinkonzentration betrug 167,5 µg/tube. Als optimale Inkubationstemperatur wurden 30°C angesehen, da bei dieser Temperatur die spezifische Bindung bereits nach 30 min im Äquilibrium war (Abb. 3).

hGH-RADIORECEPTORASSAY (rabbit liver membranes)

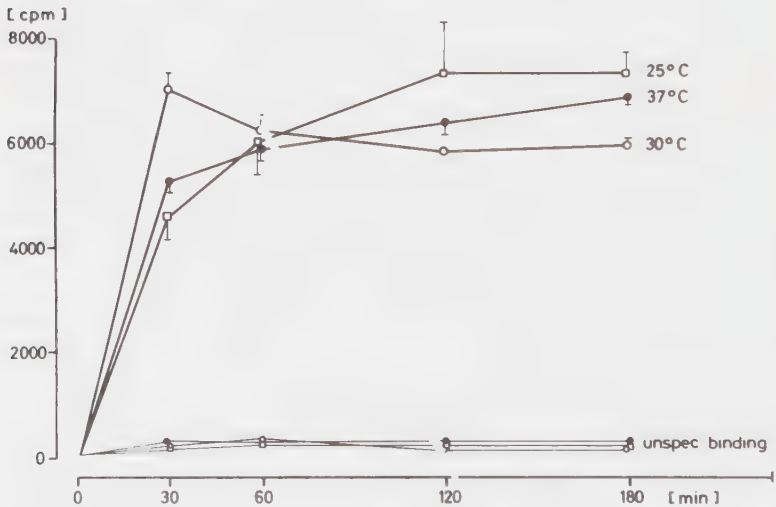


Abb. 3: Zeit und Temperaturkinetik des hGH-RRA
(Kaninchenleber, siehe Text)

3.1.2.5. Spezifische Bindung in Abhängigkeit von der Rezeptor-Proteinkonzentration

Bei konstanter Temperatur (30°C) wurden die Inkubationszeiten (30 - 60 - 120 - 180 min) und die Rezeptorproteinkonzentrationen verändert (670 - 335 - 167,4 µg/Tube). Bei allen drei Proteinkonzentrationen wurde nach 90 min ein Gleichgewicht erreicht, zwischen Rezeptorproteinkonzentration und spezifischer Bindung ist ein linearer Zusammenhang ersichtlich (Abb. 4).

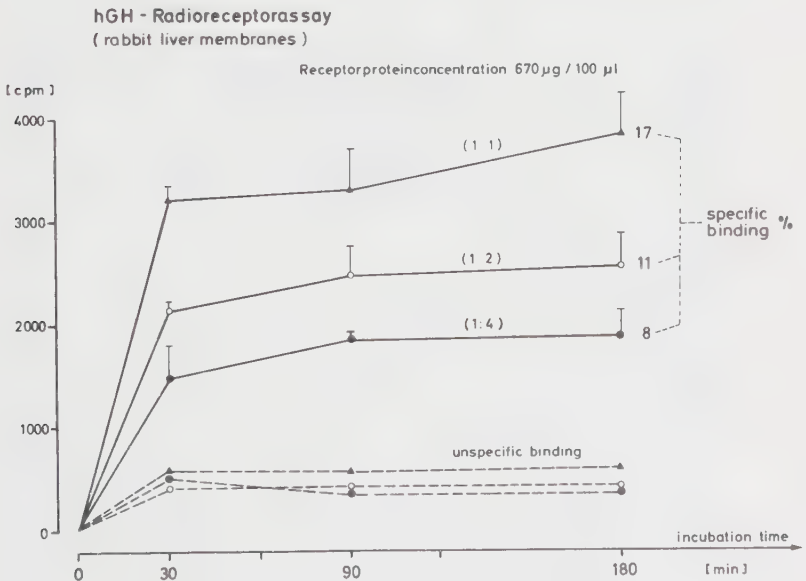


Abb. 4: Proteinkinetik des hGH-RRA (Kaninchenleber)

3.1.3. Sättigung

Unter Sättigbarkeit eines Rezeptors ist zu verstehen, daß bei einer bestimmten Hormonkonzentration alle vorhandenen Bindungsstellen besetzt sind und damit keine weitere Zunahme der spezifischen Bindung erfolgt. Dazu wurde im Sättigungsversuch bei konstanter Rezeptorproteinkonzentration Tracer in verschiedenen Verdünnungen hinzugegeben. Die Rezeptorkonzentration betrug 300 µg/Tube, die Tracerkonzentration reichte von 1,9 fM/Tube bis 104 fM/Tube, die Sättigung wurde erreicht mit 104 fM/Tube. Die spezifische Bindung schwankte zwischen 2 und 4 % (Abb. 5).

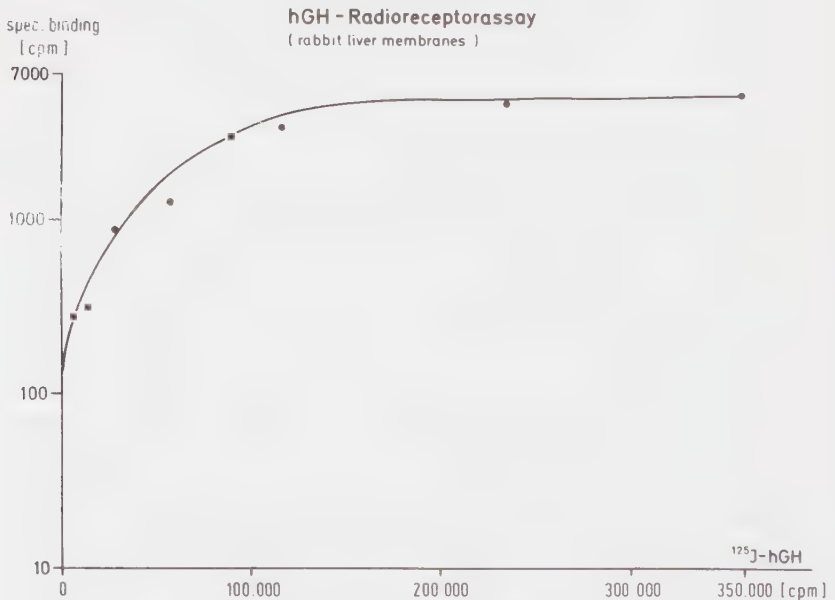


Abb. 5: Sättigungsversuch des hGH-RRA (Kaninchenleber)

3.1.4. Spezifität

Um die Frage der Spezifität des Rezeptors insbesondere die Kreuzreaktion mit den beiden anderen lactotropen Hormonen hPRL und hPL zu prüfen, wurden Verdünnungsreihen von hPL (10 bis 52.000 ng/ml) und hPRL (2,5 bis 500 ng/ml) unter den oben beschriebenen Bedingungen eingesetzt. Die hPRL-Verdrängungskurve zeigte bei 500 ng/ml erst eine Verdrängung von 15 %, eine 50 %ige Verdrängung konnte erst mit 62.000 ng/ml hPRL erreicht werden (Abb. 6). Der Kaninchenleberrezeptor zeigt somit eine wesentlich größere somatotrophe als lactotrophe Spezifität.

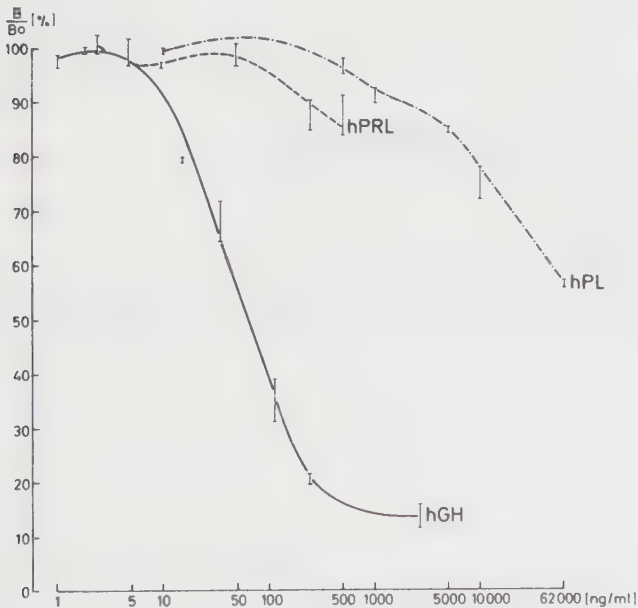


Abb. 6: Kreuzreaktivität des hGH-RRA (Kaninchenleber)

3.1.5. Dissoziation

Die Reversibilität der Bindung wurde in einem Dissoziationsversuch untersucht. Dazu wurden Rezeptor und Tracer 3 Stunden inkubiert, abzentrifugiert und das Pellet im Counter gezählt. Danach wurden zu jeder Probe 400 μ l Puffer hinzugegeben (geschüttelt und die Proben jeweils bei 30 bzw. 4°C nochmals inkubiert). Die Proben wurden dann nach unterschiedlichen Zeiten (10 - 30 - 60 - 120 - 180 - min und 16 Stunden) wiederum abzentrifugiert, abgesaugt und im Gammacounter gezählt. Die Rezeptorkonzentration betrug 134 μ g/Tube, die spezifische Bindung lag bei 11,9 %. Eine maximale Abdissoziation von markiertem Wachstumshormon war nach 3 Stunden zu sehen (Abb. 7).

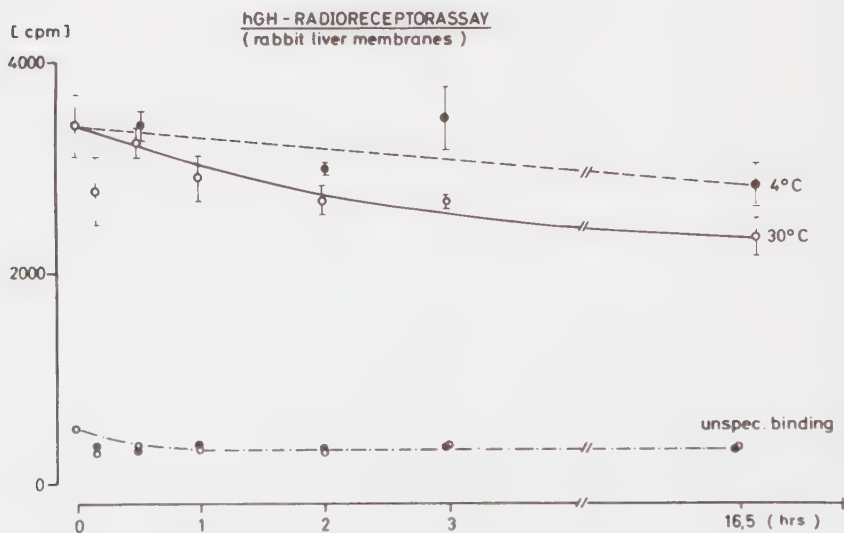


Abb. 7: Dissoziationsversuch des hGH-RRA (Kaninchenleber)

3.1.6. Scatchard Plots

Die Rezeptoraffinität sowie die Anzahl der Bindungsstellen wurden von mehreren Standardkurven nach der von Scatchard angegebenen Methode (82) errechnet. Die einzelnen Standardkurven unterschieden sich durch differente Assaypuffer, Standards oder Vorbehandlung der Kaninchen (Tab. 4a und 4b).

Tab. 4a:

I	Assaypuffer 1 mM $MgCl_2$, hGH-Standard (Gorm)	Kaninchen unbeh.
II	Assaypuffer 10 mM $MgCl_2$, hGH-Standard (Gorm)	Kaninchen unbeh.
III	Assaypuffer 10 mM $MgCl_2$, hGH-Standard (little Fraktion chromatographisch gereinigt,	Kaninchen unbeh.
IV	Assaypuffer 10 mM $MgCl_2$, hGH-Standard (Fa.Kabi)	Kaninchen mit BC vorbehandelt

Die Vorbehandlung bestand in einer dreimaligen subkutanen Injektion von jeweils 3 mg BC (Bromocriptin) über 36 Stunden.

Tab. 4b:

Gruppe	K_1 (M^{-1}) $\cdot 10^9$	B_1 (fM/mg)	K_2 (M^{-1}) $\cdot 10^9$	B_2 (fM/mg)
I	2,3	25,7	0,39	71
	2,3	30	0,37	79,6
	1,6	21	0,48	37
	2,0	40,5	0,68	53,3
	2,9	27	0,18	69
II	3,2	60	1,68	76
	3,1	45	0,34	90
III	6,8	45	0,21	120
	3,8	48	0,21	90
	3,3	46,2	0,23	196,7
	4,7	29	0,32	112,5
IV	1,8	21,4	0,88	65

Entsprechend der Zunahme der spezifischen Bindung durch Verwendung einer erhöhten Magnesiumchloridkonzentration im Assaypuffer zeigt sich eine erhöhte Anzahl an Bindungsstellen. Ebenso führt die Verwendung eines chromatographisch gereinigten hGH-Standards zu einer Zunahme der Bindung, dagegen vermindert sich die Anzahl der Bindungsstellen durch Vorbehandlung mit Bromocriptin.

3.1.7. RRA-Standardkurve in Puffer und Nullserum

Um den Einfluß von Serum auf die Rezeptorbindung zu untersuchen, wurde eine Standardkurve mit Puffer und Nullserum angesetzt. Als Nullserum wurde Patientenserum verwendet, in dem radioimmunologisch kein hGH und minimal Prolaktin nachweisbar war. Beide Kurven laufen parallel und fast deckungsgleich (Abb. 8).

Tab. 5:

	Pufferkurve	Serumkurve
Untere Nachweisgrenze	4	6 (ng/ml)
50% Intercept	98	115 (ng/ml)
Spezifische Bindung	15,2	18,2 (%)

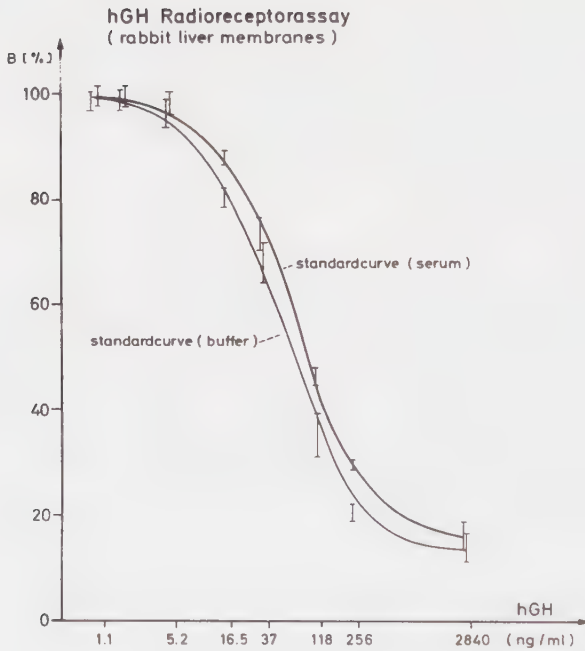


Abb. 8: Standardkurve des hGH-RRA (Kaninchenleber)
in Puffer und Nullserum

3.1.8. Serumverdünnungskurve

Weiterhin wurden eine hGH-Standardkurve zusammen mit zwei Serumverdünnungen von akromegalen Patienten angesetzt.

Tab. 6:

	Spez. Bindung (%)	50% Intercept (ng/ml)	Untere Nach- weisgrenze (ng/ml)
1. Serumverdünnung	18,2	151	4,2
2. Serumverdünnung	18,2	208	5,6
hGH (Gorm)	18,2	120	3,1

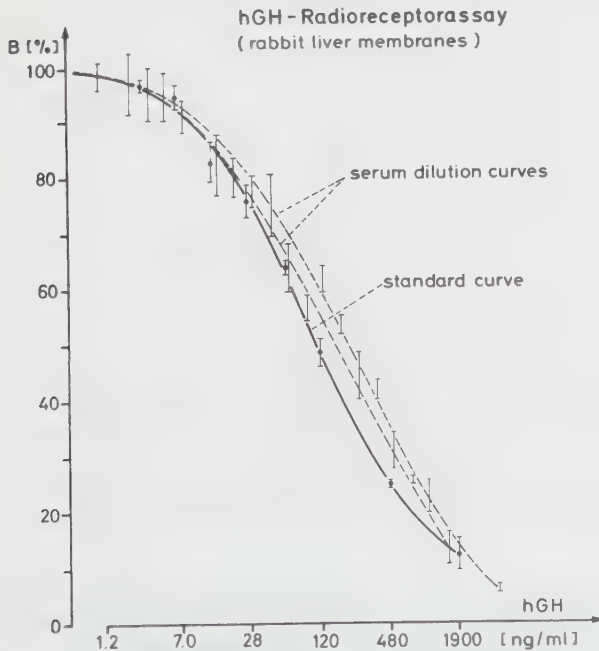


Abb. 9: hGH-RRA (Kaninchenleber): Serum- und hGH-Standard-
Verdünnungskurven

3.1.9. Chromatographische Auftrennung von hGH

Eine hypophysäre hGH-Präparation (Gorm, Fa.Serono) wurde chromatographiert und die hGH-Spiegel im Eluat sowohl im RIA als auch im RRA bestimmt. Für die big und little Fraktion ist im RIA gleiche Immunoreaktivität nachgewiesen (30,96), dagegen zeigte im RRA die hGH-big Fraktion eine deutlich niedrigere Rezeptoraktivität als die little Fraktion, der RIA/RRA-Quotient stieg von 1,5 (little) auf 4,2 (big) an.

hGH - Radioreceptorassay (rabbit liver membranes)

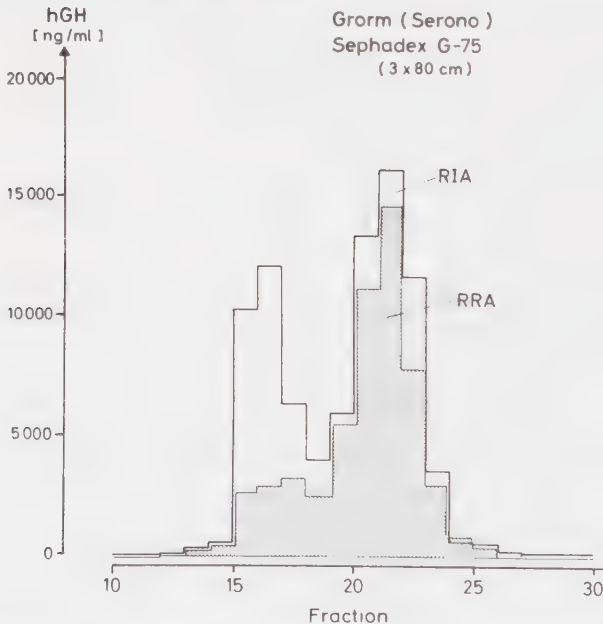


Abb.10: Chromatographisches Elutionsprofil einer hypophysären hGH-Präparation (Gorm, Fa.Serono), bestimmt im RIA und RRA (Kaninchenleber)

3.1.10. Bindungsversuch mit big und little hGH:

Hiermit sollte die Rezeptorbindung bzw. Verdrängbarkeit sowohl von little als auch big hGH gegenseitig untersucht werden. Die spezifische Bindung entspricht der Gesamtbindung abzüglich der unspezifischen Bindung. Die unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von kaltem big bzw. little-hGH im Überschuß erreicht.

Tab. 7:

	Bindung (%)	
	spez.	unspez.
$^{125}\text{J-little hGH} + \text{little hGH}$	16	6
$^{125}\text{J-little hGH} + \text{big hGH}$	16	5
$^{125}\text{J-big hGH} + \text{little hGH}$	2	11
$^{125}\text{J-big hGH} + \text{big hGH}$	4	9

3.1.11. Qualitätskontrolle

Zwei Serumkontrollen mit $K_1 = 8,3 \text{ ng/ml}$ und

$$K_2 = 14,1 \text{ ng/ml}$$

wurden bei 12 Ansätzen mitbestimmt. Daraus errechnet sich ein Variationskoeffizient von

$$K_1 = 56,2 \pm 6 \% \text{ (Intraassay)}$$

$$K_1 = 39,6 \% \text{ (Interassay)}$$

$$K_2 = 53,4 \pm 5 \% \text{ (Intraassay)}$$

$$K_2 = 30,2 \% \text{ (Interassay)}$$

Die Höhe der VK's ist bedingt durch eine unfraktionierte Aufbewahrung der Kontrollen, die für jeden Assay aufgetaut und neu eingefroren wurden. Nach Fraktionierung der Kontrollen konnten die VK's auf 15 % (Intraassay) und 20 % (Interassay) verbessert werden.

3.2. Laktogene Rezeptoren

Die Membranrezeptoren isoliert aus der Rattenleber und Kaninchenmammary wurden in gleicher Weise wie die Kaninchenlebermembranrezeptoren charakterisiert. Eine ausreichend hohe spezifische Bindung konnte jedoch erst nach Behandlung der Membranen mit hochmolarer Magnesiumchloridlösung erreicht werden.

3.2.1. Behandlung der Rezeptoren mit hochmolaren $MgCl_2$ -Lösungen

Unter der Vorstellung, daß diese Rezeptoren mit endogenem Hormon besetzt sein könnten (31, 43), wurden die Membranlösungen mit 0,5-1,5 M $MgCl_2$ -Lösungen behandelt (wie oben beschrieben). Dadurch ließ sich eine deutlich höhere spezifische Bindung sowohl bei der Rattenleber als auch bei der Kaninchenmammary für Prolaktin erreichen (Tab. 8).

Tab. 8:

Kaninchenmammary	Bindung (%)	
	spez.	unspez.
$MgCl_2$	12	5
Ø	2	2
Rattenleberrezeptor		
$MgCl_2$	12,5	4,8
Ø	4,1	3,4

3.2.2. Morphologie der Rezeptoren

Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 11, 12) ist zu ersehen, daß die Rattenlebermembranen noch durch endoplasmatisches Reticulum verunreinigt sind, die Mammembranen jedoch noch zusätzlich Verunreinigungen durch Mitochondrien und Reste von Golgi-Apparaten aufweisen.

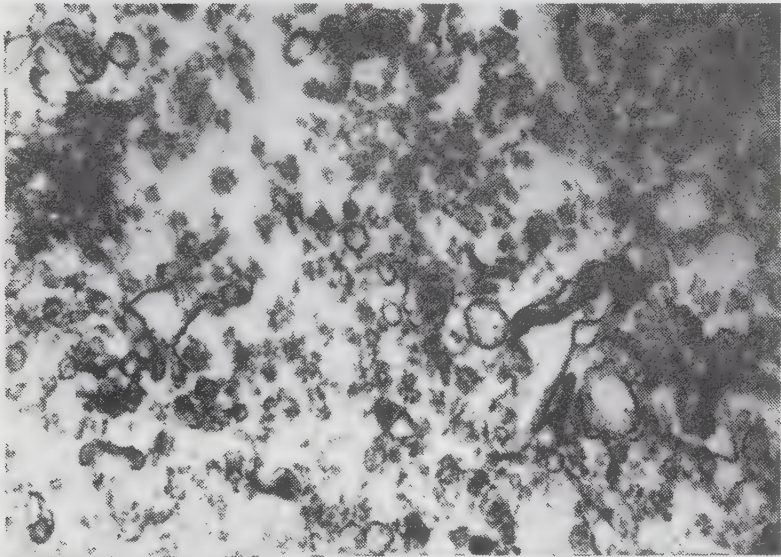


Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Kaninchen-
mammapräparation (1:30.000)

ermöglicht durch freundliche Mitarbeit von Frau
Dr. Jäger (Institut für Haematologie der Univer-
sität für Strahlenforschung, Landwehrstraße 61,
8000 München 2)

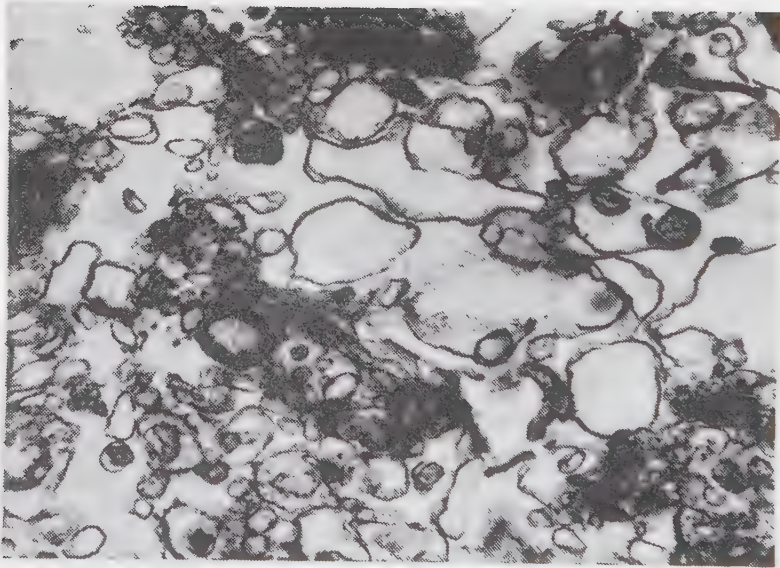


Abb. 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme der
Rattenleberpräparation (1.30.000)

Ermöglicht durch freundliche Mitarbeit von
Frau Dr. Jäger (Institut für Haematologie
der Gesellschaft für Strahlenforschung, Land-
wehrstraße 61, 8000 München 2)

3.2.3. Kinetische Untersuchungen

3.2.3.1. Zeit- und Temperaturkinetik

Diese Untersuchungen wurde für beide RRA's bei 37, 30 und 4°C über unterschiedlich lange Zeit (0,25 - 0,5 - 1,5 - 3 - 6 - 22 Stunden) durchgeführt. Die Inkubationsbedingungen sowie Zugabe der Mengen erfolgte nach dem bereits beschriebenen Schema (S. 12/14). Die Rezeptorproteinkonzentration betrug 750 µg/Tube (Mamma) bzw. 125 µg/Tube (Rattenleber).

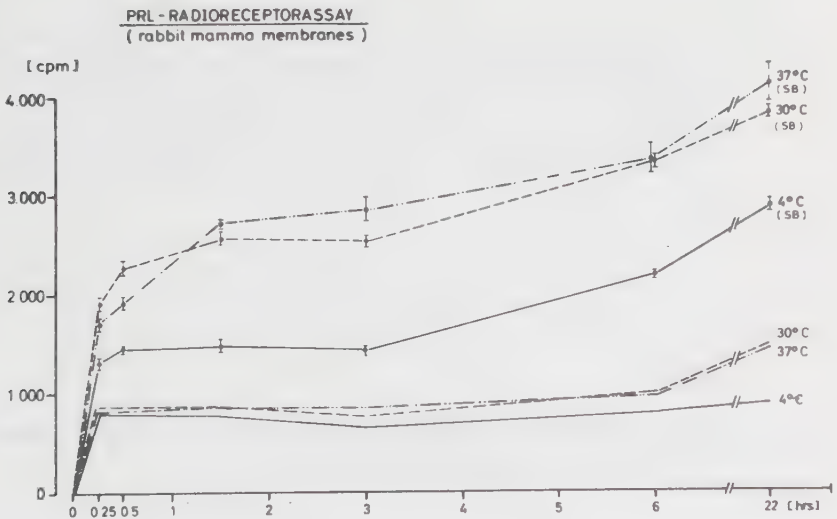


Abb. 13: Zeit- und Temperaturkinetik der Prolaktinbindung an Kaninchenmammarerezeptoren

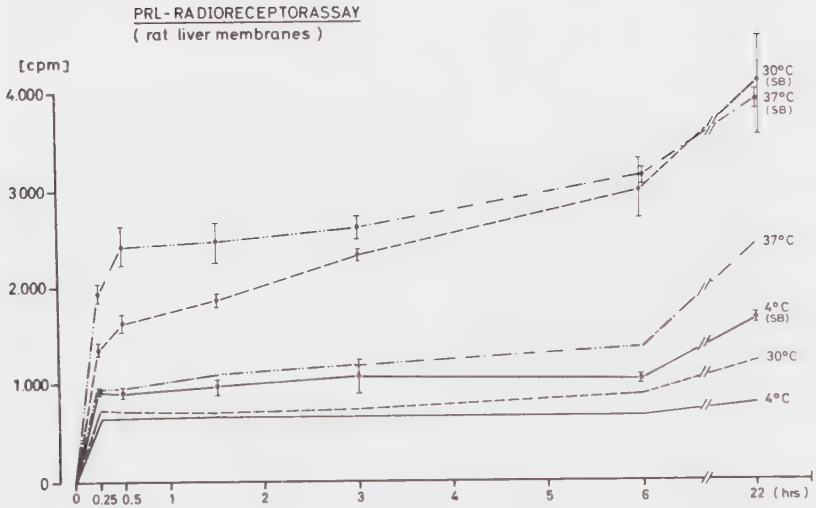


Abb. 14: Zeit- und Temperaturkinetik der Prolaktinbindung an Rattenleberrezeptoren

Bereits nach 15 bis 30 Minuten sind etwa 75 % der absoluten Bindung erreicht, nach 90 Minuten erreicht die Bindung ein Plateau. Die unspezifische Bindung liegt bei 37°C deutlich höher als bei 30 bzw. 4°C, die Gesamtbindung liegt bei 4°C deutlich niedriger. Aus diesem Grunde wurden drei Stunden als Inkubationszeit und 30°C als Inkubationstemperatur gewählt.

3.2.3.2. Bindungskinetik in Abhängigkeit von der Rezeptor-Proteinkonzentration

Sowohl für die Rattenleber- als auch für die Kaninchenmammamembranen wurden Bindungsuntersuchungen bei konstanter Temperatur (30°C) bei unterschiedlicher Rezeptor-Proteinkonzentration (Mamma: 210 - 415 - 830 µg/Tube; Rattenleber: 116 - 215 - 630 µg/Tube) und unterschiedlicher Inkubationszeit (0,25 - 0,5 - 1,5 - 3 - 6 Stunden) durchgeführt. Für beide RRA's wird nach 90 Minuten bei allen drei Proteinkonzentrationen ein Gleichgewicht erreicht (Abb. 15, 16).

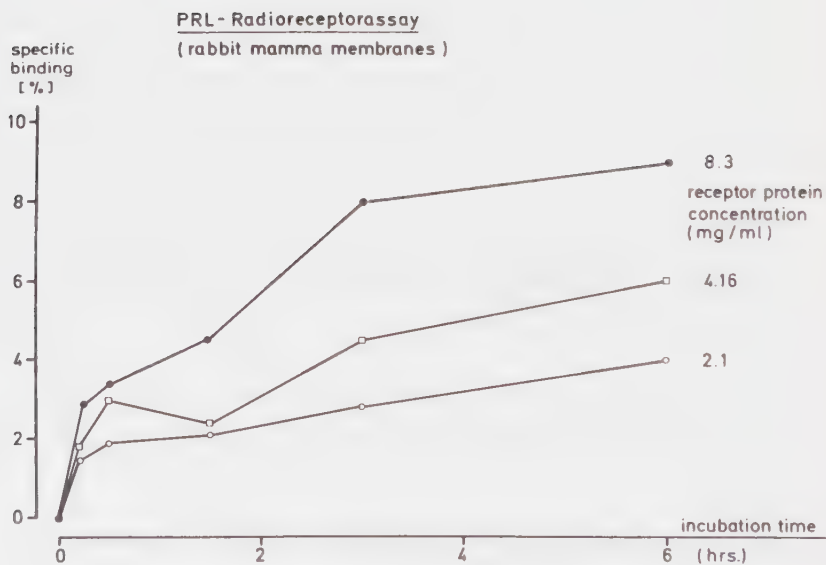


Abb. 15: Kinetik der Prolaktinbindung an Kaninchenmamma-
membranen bei unterschiedlicher Rezeptor-Protein-
konzentration

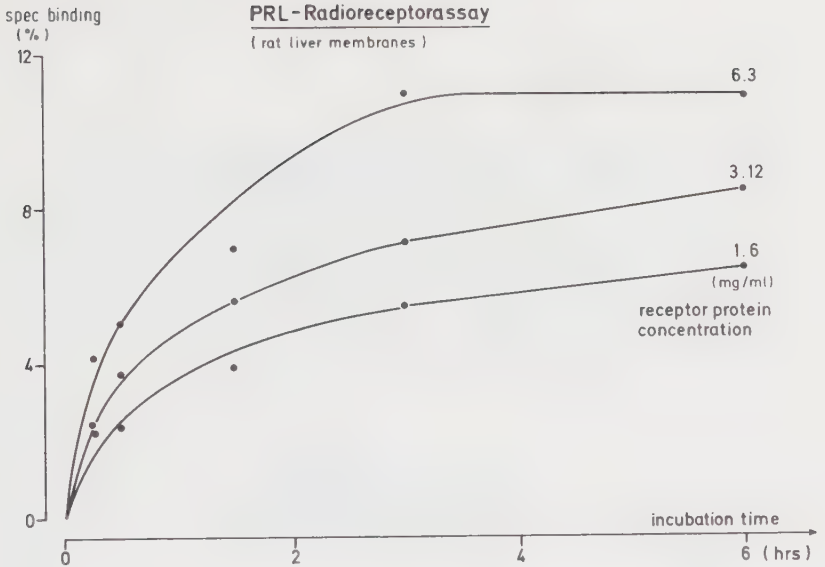


Abb. 16: Kinetik der Prolaktinbindung an Rattenlebermembranen bei unterschiedlicher Rezeptor-Proteinkonzentration

Zwischen Proteinkonzentration und spezifischer Bindung besteht ein linearer Zusammenhang, d. h. mit steigender Proteinkonzentration nimmt die spezifische Bindung proportional zu.

3.2.4. Sättigung

Der Sättigungsversuch wurde in gleicher Weise durchgeführt wie beschrieben (S. 13). Die Rezeptorproteinkonzentration betrug 550 $\mu\text{g}/\text{Tube}$ (Mamma) bzw. 150 $\mu\text{g}/\text{Tube}$ (Rattenleber). Die spezifische Bindung lag zwischen 3 bzw. 6 %. Die zur Sättigung notwendige Tracerkonzentration betrug 48 fM/Tube (Mamma, Abb. 17) und 45,9 fM/Tube (Rattenleber, Abb. 18).

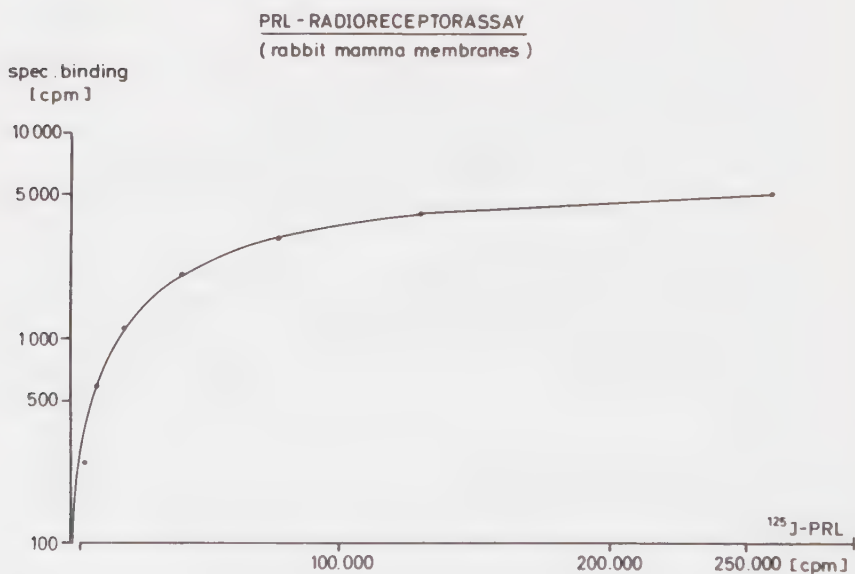


Abb. 17: Maximale Prolaktinbindung an Kaninchenmamman-
membranen (Sättigung) bei 48 fM/Tube $^{125}\text{J-hPRL}$

PRL-RADIORECEPTORASSAY
(rat liver membranes)

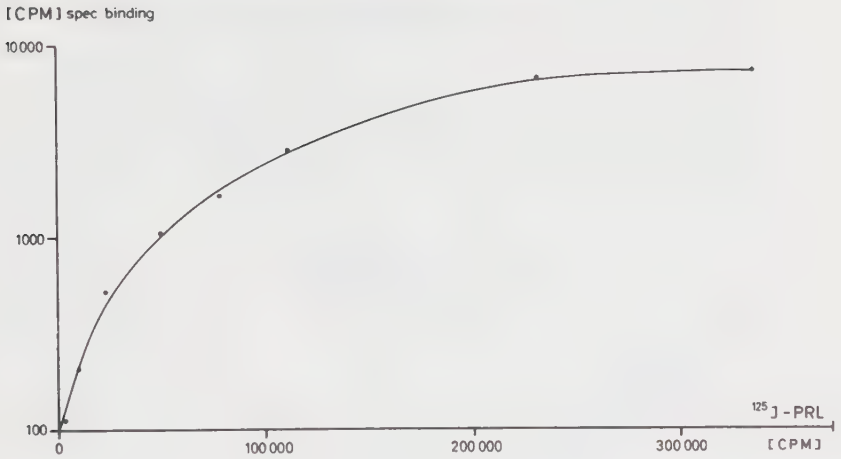


Abb. 18: Maximale Prolaktinbindung an Rattenlebermembranen
(Sättigung) bei 45,9 fM/Tube 125 J/hPRL

3.2.5. Kreuzreaktivität

3.2.5.1. Interferenz mit anderen lactogenen Hormonen

Zur Untersuchung der Spezifität wurden sowohl hGH (7 - 2.100 ng/ml), hPRL (0,01 - 32 µg/ml) als auch oPRL (6,25 - 500 ng/ml) in Verdünnungsreihen eingesetzt. Bei beiden Membranpräparationen zeigen die eingesetzten anderen lactogenen Hormone eine dem hPRL nahezu äquipotente Verdrängung (Abb. 19, 20).

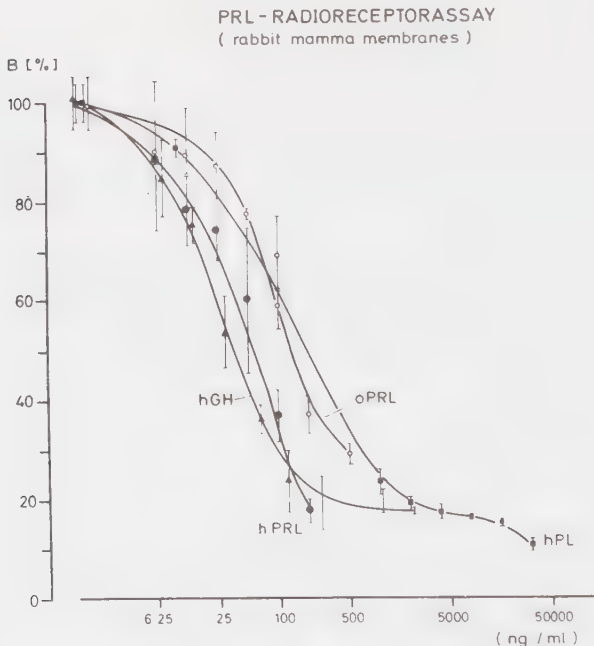


Abb. 19: Kreuzreaktivität der Bindung von hGH, hPRL und oPRL mit hPRL an Kaninchenmamamembranen

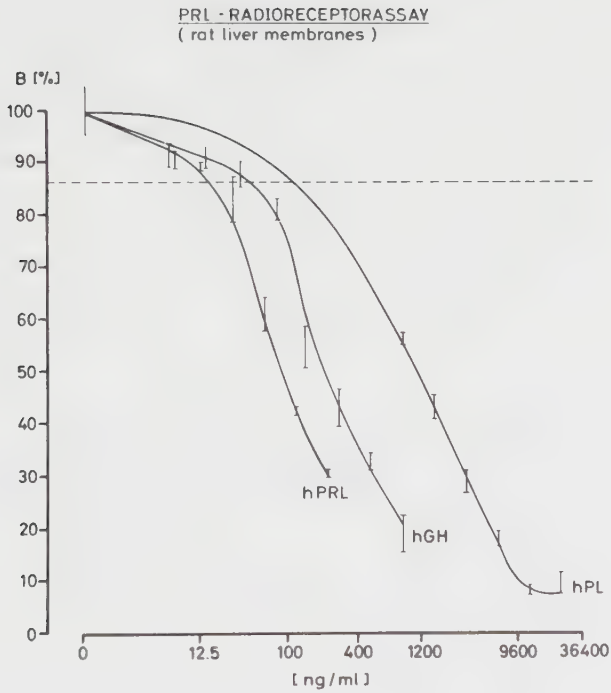


Abb. 20: Kreuzreaktivität der Bindung von hGH und hPL mit hPRL an Rattenlebermembranen

3.2.5.2. Interferenz mit Serumproteinen

Die Interferenz verschiedener Serumproteine (humanes Albumin, humanes Gammaglobulin und Kaninchengammaglobulin) mit der Prolaktinbindung an Mammamembranen wurde zum Ausschluß von Serumeffekten untersucht. Erst bei unphysiologisch hohen Proteinkonzentrationen zeigte sich ein Verdrängungseffekt durch Serumproteine am Rezeptor (Abb.21).

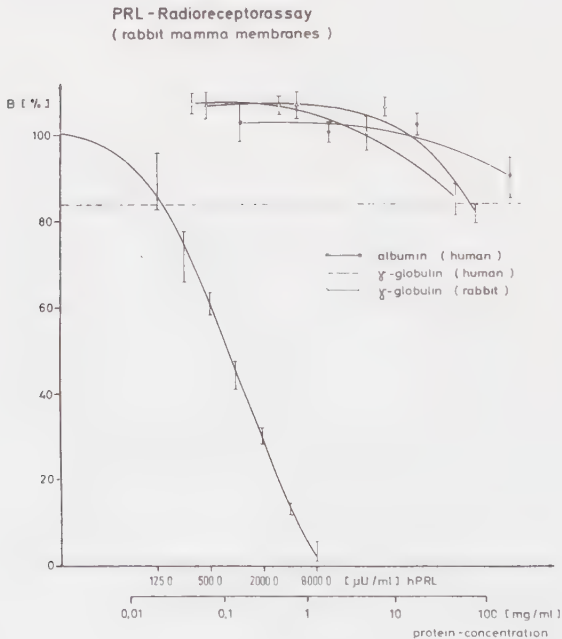


Abb. 21: Interferenz verschiedener Serumproteine (humanes Albumin, humanes Gammaglobulin und Kaninchengammaglobulin) mit der Prolaktinbindung an Kaninchenmammamembranen

3.2.6. Dissoziation

Die Abdissoziation von hPRL von den Membranen wurde in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur sowie bei unterschiedlicher Magnesiumchloridkonzentration untersucht. Die Temperatur lag bei 4 bzw. 30°C, die Dissoziation wurde zwischen 0,25 und 16 Stunden bestimmt, die Magnesiumchloridkonzentration lag bei 0,01, 1 und 5 M $MgCl_2$. Die Abdissoziation betrug bei drei Stunden 30 % (Mamma; Tab. 9) bzw. 21 % (Rattenleber; Tab. 9). Wie zusätzlich aus Abb. 22 und 23 ersichtlich, läßt sich mit hochmolarer $MgCl_2$ -Lösung Prolaktin fast vollständig von den Membranen verdrängen.

Tab. 9:

Dissoziation

	Temp. (°C)	$MgCl_2$ (M)	min				Std 16	
			15	30	90	180		
Kaninchen- mamma	4	0,01	-	-	-	22	16	% Abnahme der spez. Bindung
	30	0,01	-	-	-	30	31	
	30	1,0	24	35	55	-	-	
	30	5,0	65	53	73	-	-	
Rattenleber	4	0,01	-	-	-	19	20	
	30	0,01	-	-	-	21	27	
	30	1,0	60	65	65	-	-	
	30	5,0	77	73	72	-	-	

Abdissoziation von ^{125}J -hPRL in Abhängigkeit von $MgCl_2$ Konzentration, Temperatur und Zeit.

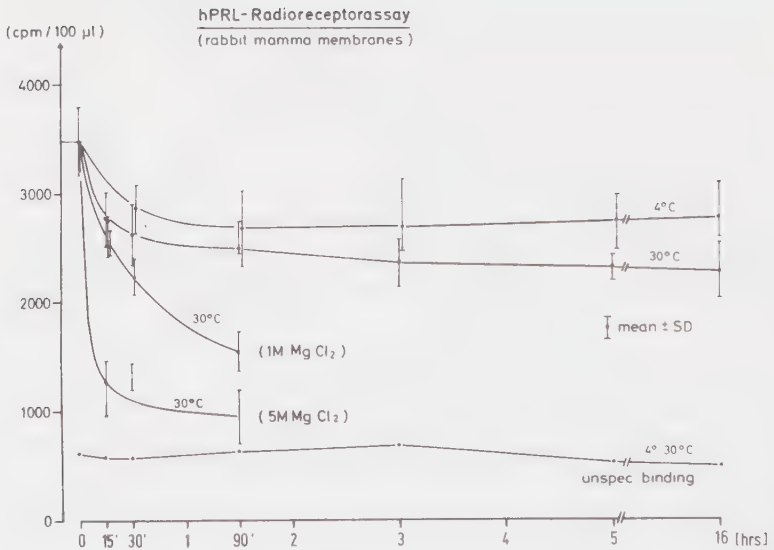


Abb. 22: Abdissoziation von ^{125}J -hPRL von Kaninchenmamma-
membranen bei unterschiedlicher Temperatur
(30, 4°C) bzw. mit Magnesiumchloridpuffer

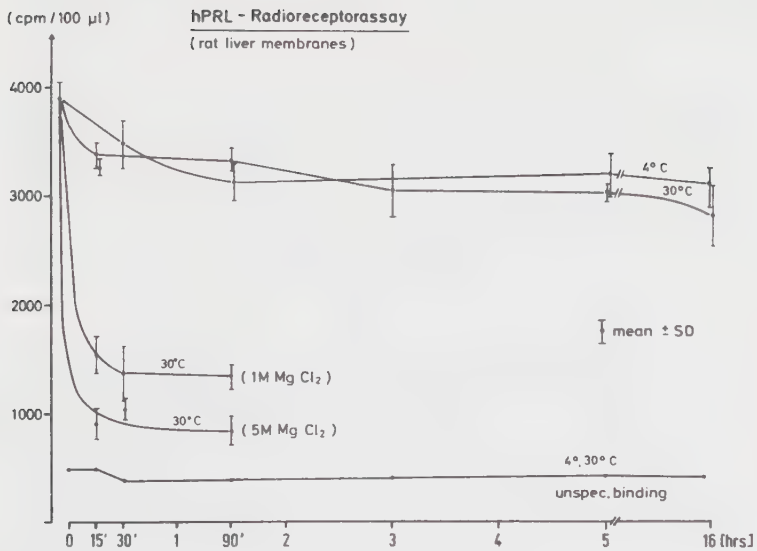


Abb. 23: Abdissoziation von 125 J-hPRL von Rattenleber-
membranen bei unterschiedlicher Temperatur
(30, 4°C) bzw. mit Magnesiumchloridpuffer

3.2.7. Scatchard-Plot

Zur Untersuchung der Bindungsverhältnisse wurden unterschiedliche PRL-Verdrängungskurven (Mamma, Rattenleber) nach Scatchard (82) ausgewertet. Vom Kaninchenmamma-RRA wurden unbehandelte (I) sowie mit Magnesiumchlorid (II) als auch mit Magnesiumchlorid und Bromocriptin (III) vorbehandelte Membranen untersucht. Vom Rattenleber-RRA wurden unbehandelte (I) und mit Magnesiumchlorid behandelte (II) Membranen ausgewertet.

Tab. 10a: Kaninchenmamma-RRA

	K_a ($M^{-1} \cdot 10^9$)	B (fM/mg Protein)
I	1,0	0,65
II	1,61	10
	2,17	6
	2,12	5,1
III	1,68	26,75
	2,44	23,2
	2,56	24,1
	2,04	27,3
	2,28	26,0

Tab. 10b: Rattenleber-RRA

Gruppe	K_a ($M^{-1} \cdot 10^9$)	B (fM/mg Protein)
I	2,68	5,56
	1,92	7,68
II	2,96	14
	2,6	12
	2,99	6
	2,9	15

Nach $MgCl_2$ -Behandlung nimmt die Zahl der Bindungsstellen deutlich zu, die Assoziationskonstante (K_a) bleibt unverändert (II. Tab. 10a,b). Die Vorbehandlung der Tiere mit Bromocriptin führt zu einer erheblichen Steigerung der Anzahl der Bindungsstellen (III, Tab.10a).

3.2.8. Nullserum- und Pufferkurven

Standardverdünnungskurven wurden in Puffer wie auch in Nullserum angesetzt. Als Nullserum wurde ein Patientenserum verwendet, dessen Prolaktinspiegel radioimmunologisch unter $25 \mu E/ml$ betrug und dessen hGH-Spiegel im RIA nicht meßbar waren. Puffer- und Serumkurven zeigen einen nahezu identischen Verlauf (Abb. 24, 25) bei beiden Rezeptorpräparationen.

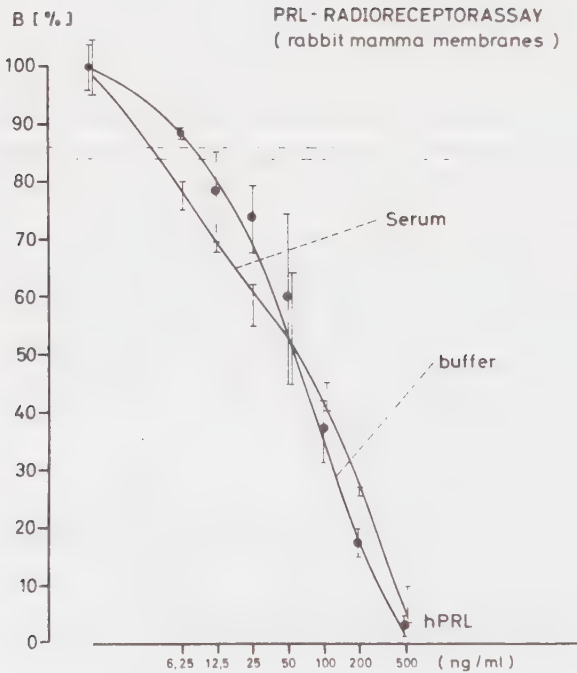


Abb. 24: Die PRL-Standardkurve mit Puffer und Nullserum (Kaninchenmamamembranen)
Gestrichelte waagerechte Linien entsprechen der unteren Nachweisgrenze ($B_0 - 3s$)

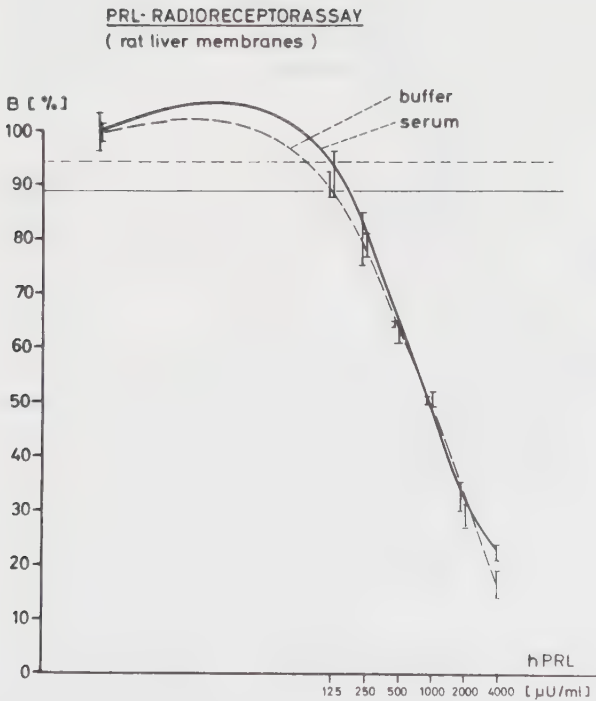


Abb. 25: PRL-Standardkurven mit Puffer und Nullserum
(Rattenlebermembranen)
Waagerechte Linien entsprechen der unteren
Nachweisgrenze ($B_0 - 3s$)

3.2.9. Serumverdünnungskurven

Um unspezifische Serumeffekte auszuschließen, wurden mehrere Seren von Patienten mit massiv erhöhten Prolaktinspiegeln in Verdünnungskurven eingesetzt. Sowohl beim Kaninchenmamma-RRR (Abb. 26) als auch beim Rattenleber-RRR (Abb. 27) zeigen die Serumverdünnungskurven einen identischen Verlauf mit der Standardkurve.

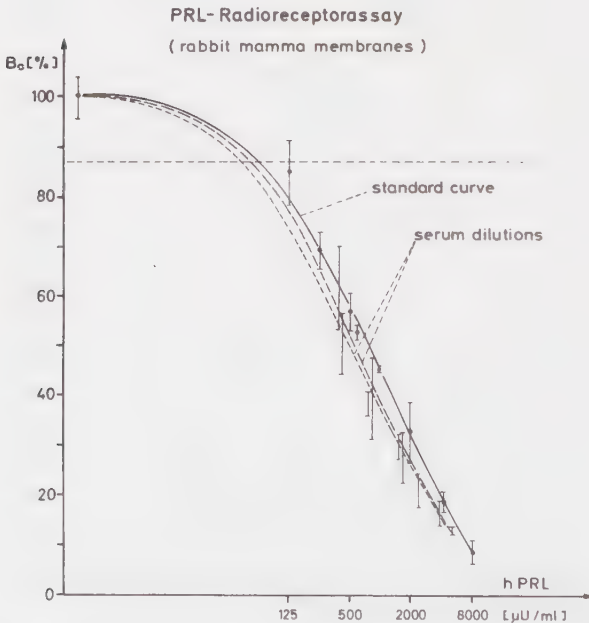


Abb. 26: Kaninchenmamma-RRR: Serumverdünnungskurven

Gestrichelte waagerechte Linie entspricht der unteren Nachweisgrenze ($B_0 - 3s$)

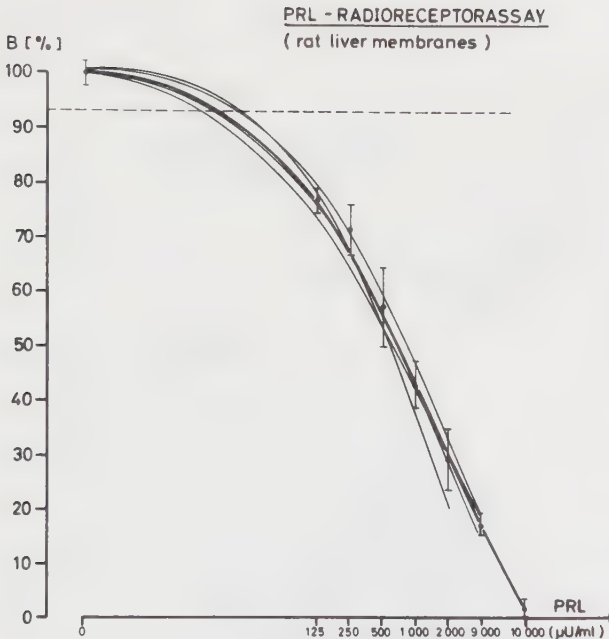


Abb. 27: Rattenleber-RRA: Serumverdünnungskurven
Gestrichelte waagerechte Linie entspricht der unteren Nachweisgrenze ($B_0 - 3s$)

3.2.10. Chromatographische Auftrennung von Prolaktin

Zur Frage unterschiedlicher RIA- bzw. RRA-Aktivität von big und little Prolaktin wurde Serum einer Patientin mit exzessiv erhöhtem Prolaktinspiegel (RIA: 665.000 μ E/ml; Kaninchenmamma-RRA: 407.000 μ E/ml; Rattenleber-RRA: 409.000 μ E/ml) auf eine Sephadex G-75 Säule (3 x 100 cm) aufgetragen und in big und little Anteile aufgetrennt.

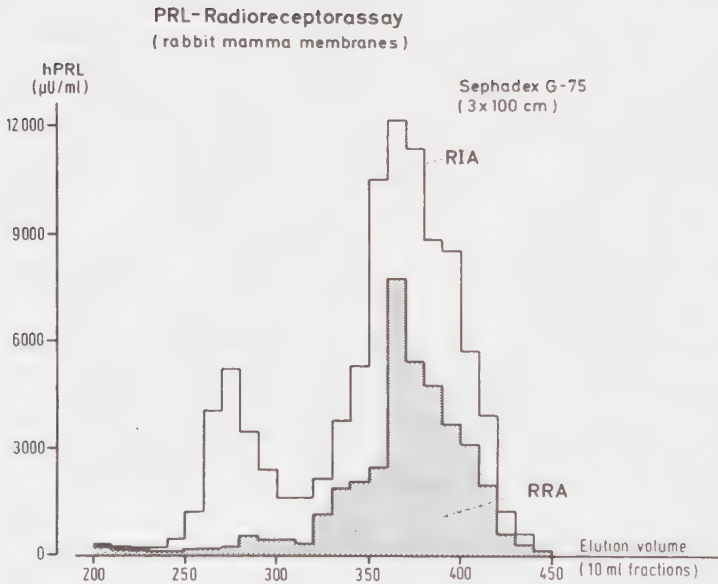


Abb. 28: Serumchromatographie eines Patienten mit Prolaktin bildendem Hypophysentumor, bestimmt im RIA und Kaninchenmamma-RRA

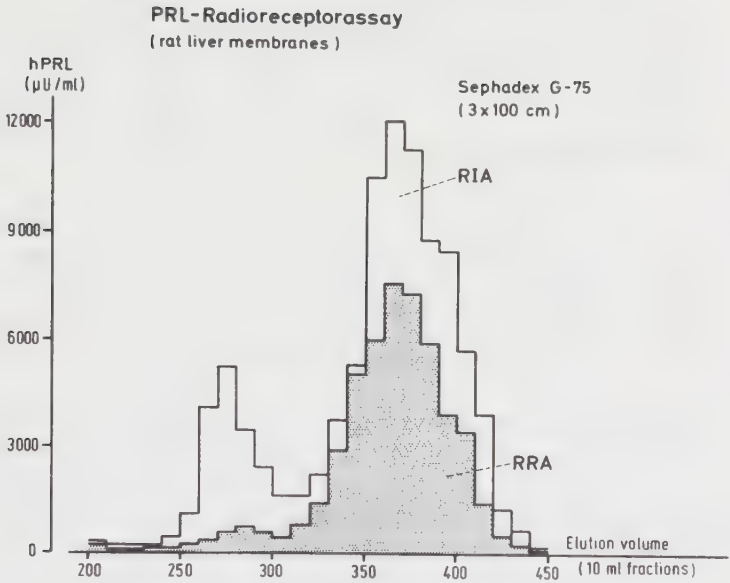


Abb. 29: Serumchromatographie eines Patienten mit Prolaktin bildendem Hypophysentumor, bestimmt im RIA und Rattenleber-RRA

Wie bereits für Wachstumshormon fand sich eine deutlich erniedrigte Rezeptoraktivität der big Fraktion gegenüber der little Fraktion von Prolaktin in beiden RRAs (Abb.28, 29).

3.2.11. Qualitätskontrolle

Eingesetzt wurden unterschiedliche Serumverdünnungen (K_1 , K_2).

Kaninchenmamma-RRA (n = 9): $K_1 = 2644 \text{ } \mu\text{E/ml}$
 $K_2 = 903 \text{ } \mu\text{E/ml}$

VK (K_1) = $10,5 \pm 6,6 \%$ (Intraassay)
VK (K_1) = 25,1 % (Interassay)
VK (K_2) = $16,8 \pm 8,8 \%$ (Intraassay)
VK (K_2) = 41 % (Interassay)

Rattenleber-RRA (n = 7): $K_1 = 1591 \text{ } \mu\text{E/ml}$
 $K_2 = 406 \text{ } \mu\text{E/ml}$

VK (K_1) = $15,7 \pm 9,3 \%$ (Intraassay)
VK (K_1) = 15,6 % (Interassay)
VK (K_2) = 30 % (Intraassay)
VK (K_2) = 35 % (Interassay)

4. ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN

4.1. Klinische Ergebnisse bei Akromegalie

Serumbestimmungen wurden an Proben von vier Gruppen akromegaler Patienten durchgeführt;

1. Prä- und postoperativ
2. Prä- und post radiationem
3. akute und chronische Bromocriptinbehandlung
4. SRIF-Test

4.1.1. Akromegale prä- und postoperativ

Bei 24 Patienten mit florider Akromegalie wurden die prä- und postoperativen hGH-Spiegel sowohl im RRA wie im RIA bestimmt und der RIA- und RRA-Quotient errechnet (Tab.11). Der Quotient präoperativ betrug $1,16 \pm 0,45$ und stieg postoperativ signifikant auf $1,64 \pm 1,19$ ($p < 0,01$) an. Die Korrelation zwischen allen bestimmten RIA- und RRA-hGH-Werten lag bei $r = 0,89$.

Pat.	präoperativ			postoperativ		
	RIA-hGH (ng/ml)	RRA-hGH (ng/ml)	RIA/RRA Quotient	RIA-hGH (ng/ml)	RRA-hGH (ng/ml)	RIA/RRA Quotient
N.P.	1456	1490	0,98	388	498	0,78
R.K.	533	820	0,65	395	329	1,20
G.L.	260	297	0,87	74	60	1,23
H.K.	211	144,5	1,46	11	7,3	1,51
A.T.	152	146	1,04	7,6	6,8	1,12
K.P.	139	107	1,30	17,9	3,0	5,97
E.W.	103	74,6	1,38	25,2	31,3	0,80
M.M.	91	66,3	1,37	1,9	1,1	1,72
J.S.	63,4	41,9	1,51	0,7	1,0	0,70
G.S.	52,2	51,6	1,01	4,9	3,0	1,63
B.G.	46	40,6	1,13	6,4	3,0	2,13
A.S.	46,2	35,1	1,32	13,2	4,2	3,14
F.E.	45	37,8	1,19	76	76	1,00
W.K.	43,3	37,9	1,42	4,9	1,6	3,06
G.N.	36,1	23,3	1,55	3,3	3,0	1,10
T.F.	35,9	44	0,82	3,3	3,0	1,10
J.S.	31,2	53,2	0,59	9,8	7,1	1,38
M.L.	29,4	33,9	0,87	38,4	33,8	1,14
G.D.	30,7	28,4	1,08	22	15,3	1,44
K.T.	25,5	20,1	1,27	6,0	3,0	2,00
I.B.	23,8	35	0,68	46	43,8	1,05
L.W.	18,2	12,9	1,41	7,6	2,5	3,04
I.A.	13,7	5,2	2,63	1,9	2,5	0,76
D.P.	5,5	12,4	0,44	19,4	25	0,77
M ⁺ SE	145,8 ⁺ 61,9	158 ⁺ 70,1	1,16 ⁺ 0,45	49,4 ⁺ 21,9	48,6 ⁺ 23,8	1,65 ⁺ 1,19

Tab. 11: hGH-RIA und RRA-Spiegel bei 24 Patienten mit aktiver Akromegalie vor und nach Hypophysenoperation

4.1.2. Akromegale vor und nach Bestrahlung

Bei fünf Patienten wurden ante und post radiationem die hGH-RIA und -RRA-Spiegel verglichen. Der RIA/RRA-Quotient lag insgesamt bei $1,43 \pm 0,64$, wobei vor Bestrahlung der Quotient bei $1,36 \pm 0,61$ lag und nach Bestrahlung auf $1,51 \pm 0,72$ anstieg.

4.1.3. Akromegale unter Therapie mit Bromocriptin

4.1.3.1. Verlauf unter Dauertherapie mit Bromocriptin

Unter der Annahme, daß bei Patienten mit aktiver Akromegalie unter akuter wie chronischer Bromocriptingabe Unterschiede in den gemessenen hGH-RRA- bzw. RIA-Spiegeln zu finden sein müßten, wurden bei zehn Patienten mit postoperativ florider Akromegalie der Verlauf der hGH-Spiegel unter ansteigender Bromocriptindosis bestimmt (Tab. 12).

Tab. 12

Pat.	RIA-hGH (ng/ml)	RRA-hGH (ng/ml)	RIA/RRA Quotient	Bromocriptin (mg/d)	Therapie (Monate)
R.K.	395	329,4	1,20	-	-
	318	266,9	1,19	40	1
	271	213	1,27	60	2
	212	196,5	1,08	60	7
G.L.	74	60,4	1,23	-	-
	34,8	25,4	1,38	15	2
	39,3	23,1	1,70	20	6
	17,9	10,6	1,69	60	18
I.B.	43	35,8	1,20	-	-
	29	19,4	1,49	30	1
	6,2	3,0	2,10	40	1,5
	5,6	1,9	2,95	40	13,5
	11,1	5,9	1,88	60	16,5
J.S.	25,6	29,2	0,88	-	-
	16,6	14,6	1,11	7,5	2
	12,9	6,1	2,10	22,5	6
E.W.	25,2	31,3	0,80	-	-
	12,2	5,0	2,44	5	0,5
	26,3	12,4	2,12	5	2
F.E.	17,3	20,4	0,85	-	-
	9,8	11,1	0,88	10	3
	9,6	8,6	1,12	20	6
	12,5	9,0	1,39	30	14
M.N.	15,2	5,9	2,58	-	-
	4,4	1,7	3,59	2,5	5
	6,2	2,9	2,14	5	8
	4,4	1,5	2,93	10	12
	4,1	1,3	3,15	10	25
	4,2	1,5	2,80	10	27
A.S.	13,2	4,2	3,14	-	-
	31,9	8,7	3,67	40	2
	22,0	7,1	3,10	40	9
M.L.	7,3	3,0	1,83	-	-
	6,1	3,0	2,03	7,5	4
	4,0	2,5	1,60	12,5	8
A.G.	4,5	4,1	1,09	-	-
	10,7	4,9	2,18	30	1,5

hGH-RIA und RRA-Spiegel bei 10 Patienten mit aktiver
Akromegalie vor und unter Langzeitbehandlung mit
Bromocriptin

Es ergab sich unter Bromocriptin ein signifikant stärkerer Abfall ($p < 0,05$) der hGH-RRA-Werte im Vergleich mit den RIA-Werten. Der RIA/RRA-Quotient zeigte entsprechend einen Anstieg von 1,4 (ohne Bromocriptin) auf 1,9 (mit Bromocriptin).

4.1.3.2. Verlauf unter akuter Belastung mit Bromocriptin

Bei 21 Patienten wurden die hGH-RIA- und RRA-Werte während eines Bromocriptintests bestimmt. Dazu wurden zwei Basalwerte im Abstand von einer halben Stunde abgenommen, dann 2,5 mg Bromocriptin (p.o.) verabreicht und stündlich über insgesamt sechs Stunden Blutproben abgenommen. Bei 14 der 21 untersuchten Patienten zeigte sich ein signifikant stärkerer Abfall ($p < 0,05$) der hGH-RRA gegenüber hGH-RIA-Spiegel (Abb. 30).

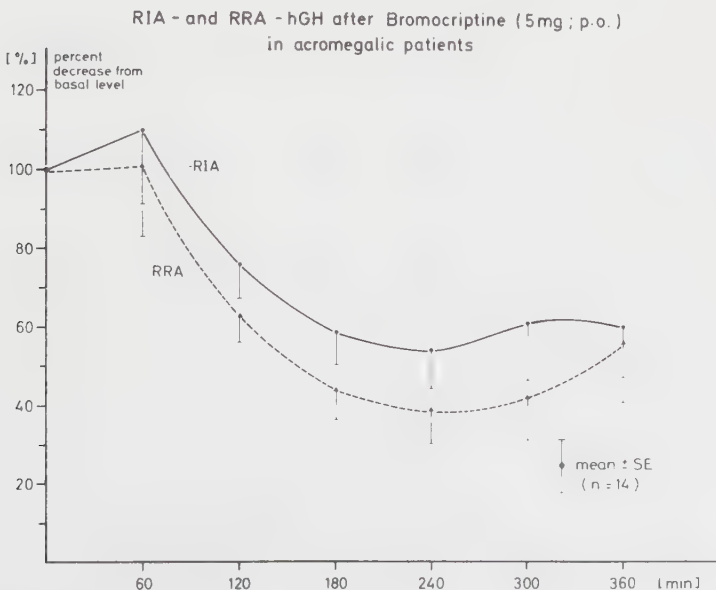


Abb. 30: Prozentualer Abfall der hGH-RIA- und RRA-Spiegel nach Gabe von 2,5 mg Bromocriptin (p.o.; n = 14)

0'		60'		120'		180'		240'		300'		360'	
RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA
G.A.	83	51	75	43	60	32	95	60	167	61	108	93	
J.B.	74	46	70	63	41	35	21	12	12	4	12	3	5
A.G.	31	14	25	3	36	6	34	6	18	3	22	10	5
D.J.	56	25	37	18	37	13	28	7	34	14	26	10	13
K.K.	4	4	2,5	1,5	2	2	2	2	3	1,5	4	2	3
G.K.	45	39	40	34	64	29	52	32	48	29	39	38	21
B.L.	52	27	53	20	40	16	29	11	25	10	28	13	16
G.L.	49	40	48	35	43	27	20	6	15	6	16	9	5
D.H.	19	18	30	29	17	20	9	10	10	7	10	9	10
L.O.	26	33	18	29	23	26	18	11	15	10	16	9	6
F.S.	51	47	174	146	54	46	21	16	15	7	11	6	4
W.T.	36	45	24	18	7	4	4	3	4	3	4	4	5
E.M.Z.	145	85	110	61	85	48	77	35	76	42	81	40	47
A.M.	34	23	33	28	14	4	9	1	8	1	8	1,5	3,5

Nonresponder

F.E.	10	7	28	10	20	9	16	7	11	8	16	9	16	8
M.G.	54	25	73	55	99	81	88	66	58	40	39	21	37	18
K.Ka.	3	3	3	4	3	6	3	5	2	4	2	4	2	3
L.	6	5	5	4	5	8	5	6	3	2	5	5	5	5
M.M.	62	41	69	48	89	60	77	62	87	34	50	42	50	36
P.	7	5	8	3	16	10	9	5	7	4	7	3	6	2
A.S.	10	3	10	5	10	5	6	4	4	5	3	3	4	3

Tab. 13: Verlauf der hGH-RIA- und -RRA-Spiegel nach Gabe von 2,5 mg Bromocriptin (p.o.) aufgeteilt in Patienten mit 50 % Abfall der hGH-Spiegel (responder) bzw. Patienten ohne ausgeprägten hGH-Abfall (nonresponder)

4.1.4. SRIF-Tests

Bei fünf akromegalen Patienten wurden die hGH-RIA- und RRA-Spiegel während einer Belastung mit Somatostatin (SRIF) bestimmt. Nach der Abnahme von zwei Basalwerten im Abstand von einer halben Stunde wurden 250 µg SRIF im Bolus gespritzt und weitere 500 µg über zwei Stunden infundiert, Blutabnahmen wurden über insgesamt drei Stunden abgenommen. Bei drei Patienten zeigte sich ein deutlich stärkerer Abfall der hGH-RRA- im Vergleich zu den hGH-RIA-Werten (Tab. 14).

Responder

	-30'		-15'		0'		30'		60'		90'		120'		150'		180'	
	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA	RIA	RRA
F.S.	35	26	31	18	65	37	28	15	13	9	10	6	11	3	22	17	146	122
J.G.	24	33	20	24	12	18	6	7	4	5	3	5	3	2	7	6	7	7
G.L.	50	25	39	16	18	12	18	6	25	3	23	7	69	21	84	33	46	16

Nonresponder

G.K.	55	-	47	28	62	51	43	20	38	19	53	39	35	17	47	22	44	27
R.K.	155	112	177	115	182	135	128	99	106	95	118	94	110	70	171	129	262	164

Tab. 14: hGH-RIA- und -RRA-Spiegel nach Somatostatin-Belastung
aufgeteilt in Patienten mit 50 %-Abfall der hGH-Spiegel (Responder)
bzw. Patienten ohne ausgeprägten hGH-Abfall (nonresponder)

4.2. Klinische Ergebnisse bei Hyperprolaktinämie

Bei Patienten mit Prolaktin-bildenden Hypophysentumoren wurden ebenfalls unterschiedliche Gruppen untersucht, vor und nach Hypophysenoperation, vor und nach Hypophysenbestrahlung sowie vor und während akuter sowie chronischer Bromocriptinmedikation.

4.2.1. Korrelation zwischen RIA und Kaninchenmamma-RRA

Zur Korrelation zwischen RIA und RRA-Werten wurden von 16 Patienten 63 Serumproben bestimmt. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,81, der Regressionskoeffizient lag bei 0,73 (Abb. 31).

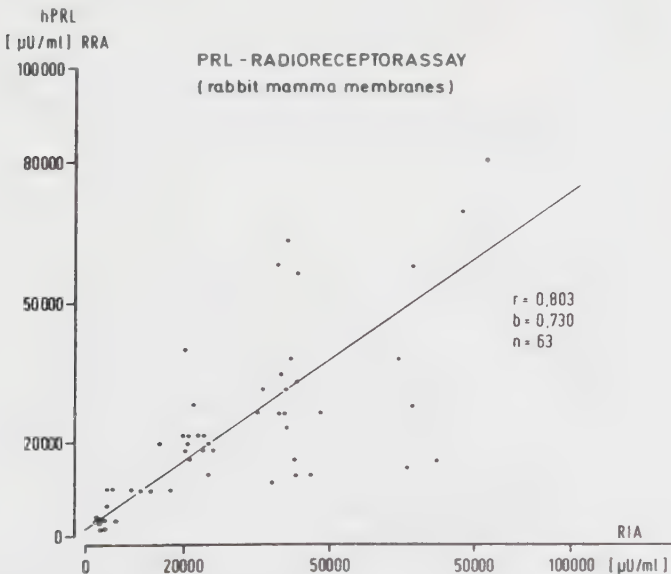


Abb. 31: Korrelation der PRL-RIA- und RRA-Werte
(Kaninchenmammamembranen)

4.2.2. Korrelation zwischen RIA und Rattenleber-RIA

Ebenso wurden von 20 Patienten 56 Serumproben untersucht, es ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,98, der Regressionskoeffizient lag bei 1,08 (Abb. 32).

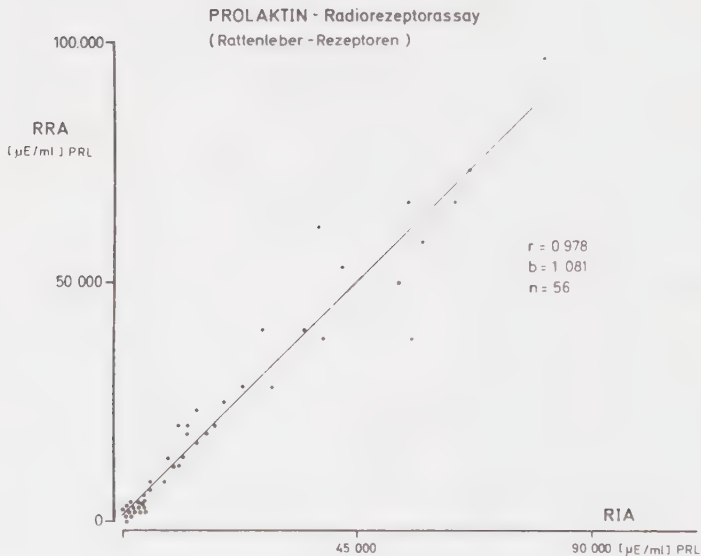


Abb. 32: Korrelation der PRL-RIA- und RRA-Werte
(Rattenlebermembranen)

Insgesamt bestand eine gute Korrelation zwischen PRL-RIA- und RRA-Werten für beide Radiorezeptorassays.

4.2.3. RIA/RRA Quotient für beide Rezeptorassays

Für die einzelnen unterschiedlichen Therapiegruppen konnten keine Unterschiede zwischen den PRL-RIA- und RRA-Werten gefunden werden (Tab. 15).

		Mamma ($\bar{x} \pm SD$)	n	Rattenleber ($\bar{x} \pm SD$)	n
I	präop.	0,82 $\pm$ 0,35	6	0,83 $\pm$ 0,17	7
	postop.	0,65 $\pm$ 0,32	6	0,75 $\pm$ 0,13	9
	Präradiat.	0,86 $\pm$ 0,21	4	0,79 $\pm$ 0,15	5
II	postradiat.	0,88 $\pm$ 0,23	4	0,84 $\pm$ 0,11	6
	ohne BC	0,83 $\pm$ 0,41	7	0,81 $\pm$ 0,18	10
III	mit BC	0,77 $\pm$ 0,54	14	0,84 $\pm$ 0,33	26

Tab. 15: RIA/RRA-Quotient

(Kaninchenmamma-, Rattenlebermembranen)

5. DISKUSSION

Indirekte Bestimmungsmethoden von Hormonen - Bioassay - erwiesen sich wegen des methodischen Aufwands, der Bestimmungsgenauigkeit und großer Störanfälligkeit als unzureichend. Erst die Entwicklung von Proteinbindungstesten bzw. des Radioimmunoassays ermöglichte eine genaue Abklärung endokrinologischer Krankheitsbilder. Damit war jedoch der Nachteil einer nur geringen biologischen Spezifität verbunden. Die Untersuchung der Hormonwirkung, d.h. der Hormonbindung an Zellmembranen sowie die Auslösung der Folgereaktion am Zielorgan führte zum Modell der Hormon-Membran-Rezeptoren (48, 94). Mit Hilfe der Autoradiographie konnte der Nachweis der Hormonbindung an Zellen geführt werden (9, 20). Durch die Isolierung von Zellmembranen konnten dann spezifische Radiorezeptorassays aufgebaut werden (50, 52, 85, 93, 101, 102). Hinsichtlich der biologischen/immunologischen Hormonaktivität erwies sich der Radiorezeptorassay als Bindeglied zwischen Bio- und Radioimmunoassay (73, 93).

Ziel der Arbeit war es, Zellmembranen aus verschiedenen tierischen Geweben zu isolieren und damit Radiorezeptorassays für lactogene Hormone aufzubauen sowie die Diskrepanz zwischen der Immuno- und Rezeptoraktivität von hGH und hPRL bezüglich der molekularen Heterogenität genauer zu untersuchen und am Beispiel der Akromegalie bzw. Hyperprolaktinämie deren klinische Bedeutung zu erforschen.

5.1. Methodik im Vergleich mit der Literatur

5.1.1. hGH-Radiorezeptorassay

5.1.1.1. Zeit- und Temperaturkinetik

Die methodischen Angaben in der Literatur über die verschiedenen Radiorezeptorassays, aufbauend auf der Mikrosomenfraktion (100.000 x g Differentialzentrifugation) (93), differieren sowohl bezüglich der Zeit und Temperatur der Inkubation als auch der spezifischen Bindung (43, 64, 65, 87, 93). Die Inkubationszeit schwankt zwischen 1,5 und 24 Stunden, die Temperatur zwischen 4 und 37°C. Eine einzige vergleichbare Arbeit, die die Gradientenzentrifugation benutzt (60), erreicht - bezogen auf die gleiche Proteinkonzentration des Rezeptors - bei kürzerer Inkubationszeit eine spezifische Bindung von 7 % gegenüber 8 % hier (Tab. 1, S. 17, Abb. 3, S. 20).

5.1.1.2. Sättigung

Der Nachweis der Sättigbarkeit des Membranrezeptors wurde nur von HERINGTON geführt (44). Die Sättigung des Rezeptors (Mikrosomenfraktion) wird mit 360 pmol ^{125}J -hGH/l angegeben, wobei die Rezeptorproteinkonzentration 600 µg betrug. Hier wurde eine Sättigung bei 1070 pmol/l bei einer Rezeptorkonzentration von 300 µg erreicht (Abb. 5 S.22). Dieser Unterschied ist am ehesten als präparationsbedingt anzusehen, bzw. durch die Verwendung eines anderen Tieres (Ratte) verursacht.

5.1.1.3. Spezifität

Die somatotrophe Spezifität des Kaninchenleberrezeptors ist mehrfach beschrieben (65). Eine halb maximale Verdrängung von $^{125}\text{J-hGH}$ findet TSUSHIMA mit $12\text{ }\mu\text{g/ml hPL}$ bzw. $100\text{ }\mu\text{g/ml hPRL}$ (93). MOORE erreicht mit $300\text{ }\mu\text{g/ml oPRL}$ eine Verdrängung von 84% $^{125}\text{J-hGH}$ (60). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den hier gefundenen überein (Abb. 6, S. 23). Im Gegensatz zu TSUSHIMA (93) und HERINGTON (43) fanden sich hier keine unspezifischen Verdrängungseffekte oder eine Herabsetzung der spezifischen Bindung durch Serumzugaben (Tab. 5, S. 27).

5.1.1.4. Reversibilität

Vergleiche mit anderen Arbeiten sind nicht möglich, da hier die freie Dissoziation von $^{125}\text{J-hGH}$ untersucht wurde, wogegen in der Literatur die Dissoziation durch Zugabe von Überschuß an kaltem Hormon bestimmt wurde. Eine völlige Reversibilität der Hormonbindung wurde auch hier nicht nachgewiesen, insgesamt waren nur $30 - 40\%$ des gebundenen hGH dissoziierbar (Abb. 7, S. 24).

5.1.1.5. Affinität

Im Vergleich mit den Angaben in der Literatur ergaben sich bezüglich der Affinität (K_a) und der Bindungsstellen (B) deutliche Unterschiede. Während KELLY (66) und MOORE (60) einen linearen Scatchard Plot mit einer $K_a = 0,9 \cdot 10^9\text{ M}^{-1}$, $B = 1640\text{ fmol/mg Protein}$ bzw. $K_a = 0,5 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}$, $B = 3,7\text{ fmol/mg Protein}$ angeben, findet HERINGTON einen nicht linearen Scatchard Plot, allerdings bei Rattenlebermembranrezept-

toren ($K_a = 6,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$, $B = 98 \text{ fmol/mg Protein}$) (44). Bei den hier benutzten Kaninchenlebermembranen errechnete sich ebenfalls ein kurvilinearer Scatchard Plot mit allerdings niedrigeren Assoziationskonstanten und Bindungsstellen (Tab. 4b, S. 26).

5.1.2. PRL-Radiorezeptorassays

TURKINGTON konnte bereits 1970 Prolaktinrezeptoren aus tierischem Mammagewebe nachweisen (94), mit Hilfe autoradiographischer Methoden konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (9, 20). Der erste Prolaktin-Radiorezeptorassay wurde 1973 von SHIU mit aus Kaninchenmammagewebe isolierten Membranrezeptoren beschrieben (85, 86). Neben Rezeptoren in der Mamma wurden Prolaktin-Rezeptoren auch an anderen Organen wie Leber (65, 101), Nebenniere (25, 58, 65) und Ovarien (65, 81), Niere (25, 58, 65), Samenbläschen (4), Prostata (1, 4), Hoden (1, 4) und Uterus (65) nachgewiesen. Alle weiteren Untersuchungen über lactogene Rezeptoren stützen sich im wesentlichen auf die von SHIU angegebenen Methoden der Rezeptorpräparation (10, 16, 21, 38, 41, 63, 65, 67, 83, 84, 85, 86).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Rezeptoren durch Differentialzentrifugation (Kaninchenmamma) wie auch durch Gradientenzentrifugation nach RAY (11, 69) - (Rattenleber) - präpariert.

Die anfänglich sehr niedrige spezifische Bindung (5 %) konnte erst durch Behandlung der Membranfraktionen durch hochmolaren Magnesiumchloridpuffer auf Werte um 20 bis 30 % angehoben werden. Als Grund fanden sich Angaben in der Literatur über

eine Rezeptorbesetzung durch endogene Hormone (45, 62). So konnte BROOKS (10) zeigen, daß bei hohen endogenen Prolaktinspiegeln eine signifikant niedrigere spezifische Bindung ermittelt wurde. Durch Magnesiumchloridbehandlung konnten die Rezeptoren freigelegt werden (17). Der gleiche Effekt konnte auch damit erreicht werden, daß die Tiere mit Bromocriptin vorbehandelt wurden und damit durch erniedrigte endogene Prolaktinspiegel eine geringere Besetzung der Rezeptoren bewirkt wurde (16, 49). Diese Befunde konnten hier bestätigt werden (Tab. 8, S. 32, Tab. 9, S. 45). Bei den zur Charakterisierung der Mamma- und Rattenleberrezeptoren notwendigen Versuchen fanden sich keine wesentlichen Unterschiede zu den in der Literatur angegebenen Werten (16, 63, 85). Teilweise erhebliche Unterschiede fanden sich jedoch bei der Bestimmung der Bindungskapazität. Während von SHIU (85) und KELLY (16) mit 57 bzw. 54 fmol/mg Protein hohe Bindungskapazitäten angegeben wurden, wurden hier 0,65 fmol/mg Protein errechnet. Erst nach Behandlung mit Magnesiumchlorid bzw. Bromocriptin konnte die Bindungskapazität auf 25 fmol/mg Protein angehoben werden. Bei KELLY dagegen betrug die Bindungskapazität nach Bromocriptinbehandlung 140 fmol/mg Protein. Im Gegensatz zu den Unterschieden in der Bindungskapazität fanden sich gut übereinstimmende Werte für die Assoziationskonstanten (Tab. 10 a und b, S. 48 und S. 49).

Die hier erhaltenen Ergebnisse aus den Untersuchungen mit Rattenlebermembranen zeigten keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der spezifischen Bindung, Kinetik, Interferenz, Sättigung im Vergleich mit den in der Literatur angegebenen (10, 21, 29, 41, 49, 65, 66). Erhebliche Unterschiede fanden

sich jedoch hier wie in der Literatur bezüglich der Assoziationskonstanten und der Bindungskapazität. So schwankten die Angaben für die Assoziationskonstante zwischen $2,4 \cdot 10^9$ und $5,6 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$, für die Bindungskapazität zwischen 70 und 820 fmol/mg Protein (29, 49, 66).

5.2. Klinische Ergebnisse

5.2.1. Akromegalie

Zwischen den radioimmunologisch und RRA-bestimmten hGH-Spiegeln fand sich hier wie bei anderen Autoren (33, 43, 87, 93) eine gute Korrelation ($r = 0,98$). Insgesamt zeigte sich jedoch, daß die im RRA gemessenen hGH-Spiegel niedriger als die radioimmunologisch bestimmten lagen (33, 36, 43, 47, 87). So wurde der RIA/RRA-Quotient von HERINGTON mit 1,4 angegeben (43), GORDON (36) fand bei Akromegalen sogar Quotienten auch unter 1. Hier wurde nun versucht, nachdem allgemein keine signifikanten Unterschiede zu finden waren, akromegale Patienten differenziert nach der Behandlung zu untersuchen. Dabei fand sich bei der Bestimmung prä- und postoperativer Seren ein Anstieg des RIA/RRA-Quotienten von 1,16 auf 1,65 postoperativ ($p < 0,05$). Dies stand auch in guter Übereinstimmung mit dem postoperativen Abfall der hGH-Spiegel und der damit verbundenen Besserung der klinischen Aktivität bei den einzelnen Patienten (Tab.11, S. 58). Als Ursache für die Unterschiede zwischen RIA- und RRA-Werten wurde die molekulare Heterogenität des hGH angesehen. Denn es konnte nachgewiesen werden, daß die Polymere von hGH (big-hGH) eine wesentlich geringere Rezeptoraktivität aufweisen, wogegen die monomere hGH-Form (little) im RRA und

RIA gleiche Aktivität zeigte (33, 38, 43, 59). Bekanntermaßen ist auch die little Fraktion der biologisch aktive Anteil des Wachstumshormons im Serum (8). GORDON (32) meinte sogar mit dem Lymphozyten-RRA im Serum von Akromegalen eine biologisch aktivere little Fraktion als bei Normalpersonen nachzuweisen.

Neben den operativen Befunden wurden auch Patienten untersucht, die aufgrund postoperativ florider Akromegalie mit erhöhten Wachstumshormonspiegeln mit Bromocriptin (BC) behandelt wurden. Bei einigen dieser Patienten konnte trotz deutlicher Besserung der klinischen Aktivität unter BC kein entsprechender Abfall der radioimmunologisch meßbaren hGH-Spiegel gefunden werden (8, 43, 90). Die Ursache für diese mehrfach beschriebene Diskrepanz war bisher ungeklärt. WASS (95) vermutete, daß diese Diskrepanz durch einen selektiven Abfall der hGH little Fraktion im Vergleich zu den höhermolekularen Fraktionen bedingt sein könnte. BENKER et al. (5) fand nach Somatostatininjektion bei der chromatographischen Auftrennung von Serumproben einen vornehmlichen Abfall der little-hGH Fraktion. Da im Gegensatz zum RRA für die verschiedenmolekularen hGH-Formen gleiche Immunoaktivität nachgewiesen werden konnte (30, 96), sollte diese Frage mit Hilfe des RRA untersucht werden. Unter der Behandlung mit Bromocriptin, sowohl akut wie chronisch, konnte bei vielen Patienten ein ausgeprägt stärkerer Abfall der hGH-RRA-Werte im Vergleich zu den RIA-Werten nachgewiesen werden. So fand sich bei 14 von 21 akut mit BC behandelten Patienten ein stärkerer Abfall des hGH-RRA-Spiegels im Vergleich zum RIA (Abb. 30, S. 61, Tab. 13, S.62), wobei es bekannt ist, daß nicht bei allen akromegalen Patienten ein Therapieerfolg mit

BC erreicht werden kann (55, 80, 90, 95). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BENKER (5) konnte auch hier unter Somatostatinbelastung ein stärkerer Abfall der hGH-RRA-Spiegel im Vergleich zu den RIA-Werten gefunden werden (Tab. 14, S. 64).

Zusammenfassend ist somit der Therapieerfolg durch BC bei der Akromegalie neben der Senkung der Wachstumshormonspiegel auch durch eine vornehmliche Suppression der biologisch aktiven hGH-Fraktion zu erklären.

5.2.2. Hyperprolaktinämie

Bei den klinischen Untersuchungen fand sich eine gute Korrelation zwischen den RIA- und RRA-Werten sowohl für den Rattenleber- als auch den Kaninchenmamma-RRA (86). Bei den nach Therapie unterschiedenen Patientengruppen fanden sich keine wesentlichen Unterschiede zu den RRA- und RIA-PRL-Spiegeln (Tab. 15, S. 67).

Eine niedrigere RRA-Aktivität der höhermolekularen Prolaktinformen im Vergleich zu den niedermolekularen ist mehrfach beschrieben (2, 21). Diese Ergebnisse konnten durch gel-chromatographische Auftrennung und Bestimmung des Elutionsprofils mit dem Kaninchenmamma- wie Rattenleber-RRA bestätigt werden (Abb. 28, 29, S. 54, 55).

6. ZUSAMMENFASSUNG

I. Methodik

1. hGH-Radiorezeptorassay (Kaninchenleber)

Rezeptoren wurden aus Lebern trächtiger Kaninchen (29. Schwangerschaftstag) nach RAY (69) isoliert. Die Inkubation wurde bei 30°C im Schüttelwasserbad mit 30-minütiger Vorinkubation und dreistündiger Tracerinkubation durchgeführt. Der Assaypuffer enthielt 0,025 M Tris-HCl, 0,01 M MgCl₂, 0,5 % Albumin, pH 7,6. Die Standardkurve reichte von 2 - 2000 ng/ml hGH. Die Rezeptorproteinkonzentration lag bei ca. 1,8 mg/ml, das Inkubationsvolumen betrug 400 µl. Die untere Nachweisgrenze lag bei 2,5 ng/ml, der 50 % Intercept bei 40 ng/ml.

2. PRL-Radiorezeptorassay (Kaninchenmammary)

Rezeptoren wurden aus der Mammary trächtiger Kaninchen (27.-30. Schwangerschaftstag) nach SHIU (85) isoliert. Die Inkubation wurde bei 30°C über drei Stunden im Schüttelwasserbad durchgeführt. Der Assaypuffer entsprach dem oben genannten. Die Rezeptorproteinkonzentration schwankte zwischen 400 und 800 µg/tube, das Inkubationsvolumen lag bei 400 µl/tube. Die Standardkurve reichte von 125 bis 4000 µE/ml hPRL, die untere Nachweisgrenze betrug 200 µE/ml, der 50% Intercept 1500 µE/ml.

3. PRL-Radiorezeptorassay (Rattenleber)

Rezeptoren wurden aus den Lebern trächtiger Ratten (12.-14. Schwangerschaftstag) nach RAY (69) isoliert. Bis auf Unterschiede in der Rezeptorproteinkonzentration (200 - 300 µg/tube) entsprechen die Angaben den unter 2. genannten.

II. Klinische Untersuchungen

1. hGH-Radiorezeptorassay

Bei 24 akromegalen Patienten fand sich ein signifikanter Anstieg des RIA/RRA-Quotienten von $1,16 \pm 0,45$ präoperativ auf $1,64 \pm 1,19$ postoperativ ($p < 0,05$).

Bei 5 Patienten fand sich ein Anstieg des RIA/RRA-Quotienten von $1,36 \pm 0,61$ vor Bestrahlung auf $1,51 \pm 0,72$ nach Bestrahlung. Unter Bromocriptindauertherapie stieg der RIA/RRA-Quotient von 1,4 signifikant auf 1,9 bei 10 Patienten an ($p < 0,05$). Unter akuter Bromocriptingabe fand sich bei 14 von 21 untersuchten Patienten ein signifikant stärkerer Abfall der hGH-Spiegel im RRA im Vergleich zum RIA. Unter SRIF-Infusion zeigten zwei von vier akromegalen Patienten ebenfalls einen stärkeren Abfall der Rezeptor-hGH-Aktivität. Der RIA/RRA-Quotient für chromatographisch gereinigtes little-hGH lag bei 1,5 gegenüber 4,2 für big-hGH.

2. PRL-Radiorezeptorassay

(Kaninchenmammas und Rattenleber)

Es konnten keine wesentlichen Unterschiede bei den einzelnen Patientengruppen mit beiden PRL-Rezeptorassays gefunden werden. Jedoch fanden sich auch hier deutliche Unterschiede in der Rezeptoraktivität von chromatographisch gereinigten big bzw. little Prolaktinfraktionen.

Summary

Human growth hormone (hGH) and human prolactin (hPRL) were measured by double antibody radioimmunoassay (RIA) and by radioreceptorassay (RRA). Liver plasma membranes from pregnant rabbits were used for the hGH-RRA and plasma membranes were prepared from mammary tissues of pregnant rabbits and from livers of pregnant rats for the PRL-RRA. There was no cross-reactivity between hGH or hPRL in the RIA; crossreactivity of hPRL in the hGH-RRA amounted to 3 % whereas hPRL and hGH showed equipotent displacing activity in the hPRL-RRA.

In 24 active acromegalics hGH-levels were measured by RIA and RRA before and after operation. The decrease of hGH-RRA levels was more pronounced compared to RIA levels leading to a significant increase of the RIA/RRA ratio after operation. An increase of the RIA/RRA ratio was observed also in acromegalic patients when hGH-levels before and after radiation were compared. Long-term treatment with bromocriptine (BC) led to a significantly more pronounced fall of hGH-RRA levels compared to RIA levels. This could also be observed in 14 of 21 acromegalics after acute administration of BC or after somatostatin infusion in 3 of 5 patients.

When pituitary hGH was fractionated by gel chromatography identical immunoreactivity was documented for big and little hGH. However, measured by RRA a significantly lower RRA activity was found in the larger molecular moieties.

When hPRL of prolactinoma serum was fractionated by gel chromatography also identical immunoreactivity was found for big and little hPRL and a significantly lower RRA-activity for the larger molecular moieties in both PRL-RRAs. But no significant differences could be found in prolactinoma patients before and after operation, radiation nor bromocriptine treatment.

These data demonstrate good agreement of basal levels of hGH/hPRL measured by RIA and RRA in acromegalics and prolactinoma patients. In acromegalics the differences between RIA and RRA levels before and after treatment may be due to a more pronounced fall of receptoractive (little) hGH whereas larger molecular moieties (big hGH) show reduced receptoractivity. This may explain clinical improvement in acromegalics after treatment without profound effect on hGH-RIA levels.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. ARGONA C., H. G. FRIESEN
Specific prolactin binding sites in the prostata
and testis of rats
Endocrinology 97, 677 (1975)
2. AUBERT M. L., P. E. GARNIER, S. L. KAPLAN, M.M. GRUMBACH
Heterogeneity of circulating human prolactin
(hPRL); decreased radioreceptor activity of "big"
hPRL
Program of the 57th Ann. Meeting of The Endocrine
Society, Abstract 59, New York (1975)
3. BALA R. M., K. A. FERGUSON, J. C. BECK
Plasma biological and immunoreactive human growth
hormone - like activity
Endocrinology 87, 506 (1970)
4. BARKEY R. J., I. SHANI, T. AMIT, D. BARCILAI
Specific binding of prolactin to seminal vesicles,
prostata and testicular homogenates of immature,
mature and aged rats
J. of Endocrinol. 74, 163 (1977)
5. BENKER G., C. H. MORTIMER, A. CHAIT, P. J. LOWRY, G. M.
BESSER, D. H. COY, A. KASTIN, A. V. SCHALLY
Heterogeneity of human growth hormone in plasma
and urine: influence of growth hormone release in-
hibiting hormone
Acta Endocr. (Kbh.) Suppl. 193, 72 (1972)
6. BERSON S. A., R. S. YALOW
Clinic applications of radioimmunoassay of plasma
parathyroid hormone
Am. J. Med. 50, 623 (1971)
7. BERSON S. A., R. S. YALOW
Heterogeneity of peptide hormones in plasma as
revealed by radioimmunoassay
In: Proceedings of the XI Reunion of French
speaking Endocrinologists, Paris, Masson & Cie. (1971)
8. BESSER H. G. M., M. O. THORNER et al.

reported on Bromocriptin treatment of acromegaly
Quarterly J. of Medicine 45, 695 (1976)

9. BIRKENSHAW N., I. R. FALCONER
The localization of prolactin labelled with
radioactive iodine in rabbit mammary tissue
J. of Endocrinol. 55, 323 (1972)
10. BROOKS C. C., C. W. WELSCH
Effect of the association time on in vivo bound
prolactin on the ^{125}I prolactin receptor assays
of female rat livers
Mol. Cell. Endocrinol. 11, 145 (1978)
11. BROWN A. E., M. P. LOK, J. ELOVSON
Improved method for the isolation of rat liver
plasma membrane
Biochemica et Biophysica Acta 426, 418 (1976)
12. CHIODINI P. G., A. LIUZZI, L. BOTALLA, G. OPPIZZI, E.
E. MÜLLER, F. SILVESTRI
Stable reduction of plasma growth hormone (hGH)
levels during chronic administration of 2-Br-
ergocryptine (CB-154) in acromegalic patients
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 705 (1975)
13. CRYER P. E., W. H. DAUGHADAY
Growth hormone
In: Clinical Neuroendocrinology, Eds. Martini,
Besser, Acad. Press N. Y. 243 (1977)
14. CUATRECASAS P.
Hormone receptors - their function in cell membranes
and some problems related to methodology
Adv. Cyclic Nucleot. Res. 5, 79 (1975)
15. DAUGHADAY W. H.
The adenohypophysis
In: Textbook of endocrinology, Ed. R. H. Williams,
W. B. Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto
(1974)
16. DJIANE J., P. DURAND, P. A. KELLY
Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary
gland during pregnancy and lactation
Endocrinology 100, 1348 (1977)

17. DJIANE J., P. A. KELLY
Measurement of unoccupied and total prolactin binding sites
59th Ann. Meeting Endocr. Soc. Chicago, Abstract 291 (1977)
18. FAHLBUSCH R., H. K. RJOSK, K. von WERDER
Operative treatment of prolactin producing adenomas
In: Treatment of Pituitary Adenomas, Eds. R. Fahlbusch, K. v. Werder, G. Thieme Publishers, Stuttgart 225 (1978)
19. FAHLBUSCH R., K. von WERDER
Endocrine tests for evaluation of diagnosis and surgical treatment of pituitary adenomas with endocrine activity
Vth Internat. Congress of Neurological Surgery, Tokyo, Japan 1973, Excerpta Medica, Amsterdam, Abstract 59 (1973)
20. FALCONER I. R.
Uptake and binding of ^{125}J labelled prolactin by mammary tissue
Biochem. J. 126, 8 (1972)
21. FARKOUH N. H., M. G. PARKER, A. G. FRANTZ
Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: High proportion in basal state and reduction after thyreotropin-releasing hormone
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48, 1026 (1979)
22. FELIXBERGER F. X.
Homologer Radioimmunoassay für menschliches Prolaktin
Dissertation an der Med. Klinik Innenstadt der Universität München (1980)
23. FORSYTH I. A., I. D. DUNTIN, C. S. NICOLL
A pigeon crop sac radioreceptorassay for prolactin
J. of Endocrinol. 79, 349 (1978)

24. FORSYTH I. A., C. R. W. EDWARDS
Human prolactin. Its isolation, assay and clinical applications
Clin. Endocrinology 1, 29 (1972)
25. FRANTZ W. L., J. H. Mac INDOE, R. W. TURKINGTON
Prolactin receptors: Characteristics of the particulate binding activity
J. of Endocrinol. 60, 485 (1974)
26. FROHMAN L. A., L. BUREK, M. E. STACHURA
Characterization of growth hormone of different molecular weights in rat, dog and human pituitaries
Endocrinology 91, 262 (1972)
27. GAVIN J. R., J. A. ARCHER, M. A. LESNIAK, J. ROTH
Hormone receptor interactions in circulating cells: Studies in normal and pathologic states in man
J. Clin. Invest. 51, 35a (1972)
28. GAVIN J. R., J. ROTH, M. A. LESNIAK
Hormone receptors in circulating cells: A new approach to endocrine diseases in man
Excerpta Medica Internat. Congr. Series No 256, Fourth Internat. Congr. of Endocrinology, Abstract 496 (1972)
29. GELATO M., S. MARSHALL, M. BOUDROAN, J. BRENNI, G. A. CAMPBELL, J. MEITES
Effects of thyroid and ovaries on prolactin binding activity in rat liver
Endocrinology 96, 1292 (1975)
30. GOODMAN A. P., R. TANENBAUM, D. RABINOWITZ
Existence of two forms of immunoreactive growth hormone in human plasma
J. Clin. Endocrinol. Metab. 35, 868 (1972)
31. GORDON P., C. M. HENDRICKS, J. ROTH
Evidence for "big" and "little" components of human plasma and pituitary growth hormone
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 178 (1973)
32. GORDON P., M. A. LESNIAK, R. EASTMAN, C. M. HENDRICKS, J. ROTH
Evidence for higher proportion of "little" growth hormone with increased radioreceptor-activity in acromegalic plasma
J. Clin. Endocrinol. Metab. 43, 364 (1976)

33. GORDON P., M. A. LESNIAK, C. M. HENDRICKS, J. ROTH
Big growth hormone components from human plasma:
Decreased reactivity demonstrated by radioreceptor-
assay
Science 23, 829 (1973)
34. GORDON P., M. A. LESNIAK, C. M. HENDRICKS, J. ROTH,
W. Mc GUFFIN, J. R. GAVIN
Application of a radioreceptorassay to the study of
human growth hormone
In: Advances in Human Growth Hormone Research,
Ed. Raiti S., 545 (1973)
35. GORDON P., M. A. LESNIAK, C. M. HENDRICKS
Radioreceptor and gel filtration characterization
of plasma growth hormone in disease states
56th Ann. Meeting of the Endocrine Society,
Abstract 157 (1974)
36. GORDON P., M. A. LESNIAK, C. M. HENDRICKS, J. ROTH,
W. Mc GUFFIN, J. R. GAVIN III
Human Growth Hormone
Characterization of plasma and pituitary components
and application of a new radioreceptor assay
In: Heterogeneity of Polypeptide Hormones, Eds.
Rabinowitz D., J. Roth, Acad. Press N. Y., 57 (1974)
37. GREENSPAN F. S., C. H. LI, M. E. SIMPSON, H. M. EVANS
Bioassay of hypophyseal growth hormone: The tibia test
Endocrinology 45, 445 (1949)
38. GUYDA H. J.
Heterogeneity of human growth hormone and prolactin
secreted in vitro: Immunoassay and radioreceptorassay
correlation
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 953 (1975)
39. HABENER F. J., H. M. KRONENBERG
Parathyroid hormone biosynthesis: Structure and
function of biosynthetic precursors
Federation Proceedings Vol. 37, No 12 (1978)

40. HARDY J., F. ROBERT, M. SOMMA, J. L. VEZINA
Acromégalie - gigantisme. Traitement chirurgical
par exérèse transsphénoïdale de l'adenome hypo-
physaire
Neurochirurgie 19, Suppl. 2 (1973)
41. HAYDEN T. J., R. C. BONNEY, I. A. FORSYTH
Ontogeny and control of prolactin receptors in
the mammary and liver of virgin, pregnant and
lactating rats
J. of Endocrinol. 80, 259 (1979)
42. HEESSEN D., U. FRICKE, R. MIES, O. WILCKE, W. WINKELMANN
Wachstumshormon und Hypophysenfunktion vor und
nach 90-Yttriumimplantation bei Akromegalie
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79, 1243 (1973)
43. HERINGTON A.C., L. S. JACOBS, W. H. DAUGHADAY
Radioreceptor and radioimmunoassay quantitation
of human growth hormone in acromegalic serum:
Overestimation by immunoassay and systematic
differences between antisera
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 257 (1974)
44. HERINGTON A. C., N. VEITH, H. G. BURGER
Characterization of the binding of human growth
hormone to microsomal membranes from rat liver
Biochem. J. 158, 61 (1976)
45. HOLOCOMB H. H., M. E. COSTLOW, R. A. BUSCHOW, W. L. Mc GUIRE
Prolactin binding in rat mammary gland during
pregnancy and lactation
Biochemica et Biophysica Acta 428, 104 (1976)
46. JACOB A., CH. HACERI, E. R. FROESCH
Nonsuppressible insulin like activity in human serum.
III. Differentiation of two distinct molecules with
nonsuppressible ILA
J. Clin. Invest. 47, 2678 (1968)
47. JACOBS W. S., D. S. SNEID, J. T. GARLAND, Z. LARON,
W. H. DAUGHADAY
Receptor-active growth hormone in Laron dwarfism
J. Clin. Endocrinol. Metab. 42, 403 (1976)

48. KAHN R. C., K. MEGYSI, R. S. BAR, R. C. EASTMAN,
J. S. FLIER
Receptors for peptide hormones; New insights
into the pathophysiology of disease states in man
Annals of Internal Medicine 86, 205 (1977)
49. KELLY P. A., L. FERLAND, F. LABRICE
Endocrine control of prolactin receptors
In: Progr. in Prolactin Physiol. and Pathol., Eds. Robyn C.,
M. Harter, Elsevier/North Holland 59 (1978)
50. LANG O.
Präparation von Leberzellmembranen und Aufbau
eines Radiorezeptorassays für hGH
Dissertation an der Med. Klinik Innenstadt der
Universität München (1980)
51. LAWRENCE J. H., C. A. TOBIAS, J. A. LINFOOT, J. L. BORN,
J. T. LYMAN, C. Y. CHONG, E. MANOUGIAN, W. C. WEI
Successful treatment of acromegaly. Metabolic and
clinical studies in 145 patients
J. Clin. Endocrinol. Metab. 31, 180 (1970)
52. LEFKOWITZ, R. F., J. ROTH
Radioreceptorassay of adrenocorticotrophic hormone:
New approach to assay of polypeptide hormones in
plasma
Science 170, 633 (1970)
53. LESNIAK M. A., J. ROTH, P. GORDON
Human growth hormone radioreceptorassay using
cultured human lymphocytes
Nature (New. Biol.) 241, 20 (1973)
54. LEVIN S. R., F. D. HOFELDT, V. SCHNEIDER, N. BECKER,
J. H. KARAM, R. J. SEYMOUR, J. E. ADAMS, P. H. FORSHAM
Cryohypophysectomy for acromegaly: Factors associated
with an altered endocrine function and carbohydrate
metabolism
Am. J. Med. 57, 526 (1974)

55. LIUZZI A., P. G. CHIODINI, L. BOTALLA, C. CREMASOLI,
E. E. MÜLLER, F. SILVESTRI
Decreased plasma growth hormone (GH) levels in
acromegalics following CB-154 (2-Br- α -ergocryptine)
administration
J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 910 (1974)
56. LOWRY O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. LEWIS FARR, R. J. RANDALL
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
57. MARSCHNER I., F. EHRHARDT, P. C. SCRIBA
Calculation of the radioimmunoassay standard curve
by "spline function"
In: Radioimmunoassay and related procedures in
medicine (Band I), Eds. E. J. Garcia, E. H. Belcher
IAEA Wien (1974)
58. MARSHALL S., M. GELATO, J. MEITES
Serum prolactin levels and prolactin binding
activity in adrenals and kidneys of male rats
after dehydration, salt loading and unilateral
nephrectomy (38769)
PSEBM 149, 185 (1975)
59. MOORE W. V., D. JIN
Polymeric and monomeric human growth hormone
binding to rat liver plasma membranes
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46, 374 (1978)
60. MOORE W. V., P. LEPPERT
Binding of native and reduced and carbamidomethy-
lated hGH to rabbit plasma membranes
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, 569 (1977)
61. NEEB S., W. GRABNER
Akromegalie
Med. Klin. 74, 573 (1979)
62. Mc NEILLY A. S., H. G. FRIESEN
Binding of prolactin to the rabbit mammary gland
during pregnancy
J. of Endocrinol. 74, 507 (1977)

63. PERRY H. M., L. S. JACOBS
Rabbit mammary prolactin receptors: Demonstration
of a late puerperal increase in affinity
J. Biol. Chem. 253, 1560 (1978)
64. POSNER B. J.
Characterization and modulation of growth hormone
and prolactin binding in mouse liver
Endocrinology 98, 645 (1976)
65. POSNER B. J., P. A. KELLY, R. P. C. SHIU, H. G. FRIESEN
Studies of insulin, growth hormone and prolactin
binding: Tissue distribution, species variation
and characterization
Endocrinology 95, 521 (1974)
66. POSNER B. J., P. A. KELLY, R. P. C. SHIU, H. G. FRIESEN
Studies of insulin, growth hormone and prolactin
binding: Ontogenesis, effects of sex and pregnancy
Endocrinology 95, 532 (1974)
67. POWELL B. L., V. P. HOLLANDER
Studies on the dissoziation of prolactin from
mammary tumor membranes
Endocrinology 103, 710 (1978)
68. RANKE B. M., D. GUPTA, J. BIERICH
A direct radioreceptorassay for human growth hormone
in serum using cultured human lymphocytes
IAEA-SM-220, 14 (1978)
69. RAY R. K.
A modified method for the isolation of the plasma
membrane from rat liver
Biochemica et Biophysica Acta 196, 1 (1970)
70. REES H. L.
Human adrenocorticotropin and lipoprotein (MSH)
in health and disease
In: Clinical Neuroendocrinology, Eds. Martini, Besser,
Acad. Press N. Y., 401 (1977)

71. RIGOPOULOU D., I. VALVERDE, J. MARCO, G. FALOONA,
R. G. UNGER
Large glucagon immunoreactivity in extracts of
pancreas
J. Biol. Chem. 245, 496 (1970)
72. ROGOL A. D., A. GRUMBACH
Radioiodinated human pituitary and amniotic fluid
prolactins with preserved molecular integrity
Endocrinology 97, 406 (1975)
73. ROGOL A. D., S. W. ROSEN
Prolactin of apparent large molecular size: The
major immunoreactive prolactin component of a
patient with a pituitary tumor
J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 714 (1974)
74. ROOT A. W.
Human pituitary growth hormone
Charles C. Thomas Publ., Springfield I, 11 (1972)
75. ROTH J.
Peptide hormone bindings to receptors: A review
of direct studies in vitro
Metabolism 22, 1059 (1973)
76. ROTH J.
Assay of peptide hormones using cell receptors:
Application to insulin and to human growth hormone
In: Methods in Enzymology, Eds. Colwick S. P.,
N. O. Kaplan, 37 Hormone Action Part B, Peptide
Hormones, O'Malley B. W., J. G. Hardman (eds.)
Acad. Press N. Y., 66 (1975)
77. ROTH J. S., S. M. GLICK, R. S. YALOW, S. A. BERSON
Hypoglycemia: A potent stimulus to secretion of
growth hormone
Science 140, 987 (1963)
78. ROTH J., P. GORDEN, J. PASTAN
Efficacy of conventional pituitary irradiation
in acromegaly
New Engl. J. Med. 282, 1385 (1970)

79. ROTH J., M. A. LESNIAK
Insulin action
In: Proceedings of Symposium, Toronto 1971,
Ed. Fritz J. B., Acad. Press N. Y. 186-187,
202-203 (1972)
80. SACHADEV Y., W. M. G. TURNBRIDGE, D. R. WEIGHTMAN
Bromocriptin therapy in acromegaly
Lancet 4, 1164 (1975)
81. SAITON T., B. B. SAXENA
Specific receptors for prolactin in the ovary
Acta Endocrinologica 80, 126 (1975)
82. SCATCHARD G.
The attractions of proteins for small molecules
and ions
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)
83. SHERMAN B. M., J. I. STAGNER, R. ZAMUDIO
Regulation of lactogenic hormone binding in rat
liver by steroid hormones
Endocrinology 100, 101 (1977)
84. SHETH N. A., S. S. TIKEKAR, K. J. RANADIVE, A. R. SHETH
Influence of bromoergocryptine on estrogen-modulated
prolactin receptors of mouse mammary gland
Mol. and Cell. Endocrinol. 12, 167 (1978)
85. SHIU R. P. C., H. G. FRIESEN
Properties of a prolactin receptor from rabbit
mammary gland
Biochem. J. 140, 301 (1974)
86. SHIU R. P. C., P. A. KELLY, H. G. FRIESEN
Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic
hormones
Science 180, 968 (1973)
87. SNEID D. S., L. S. JACOBS, V. V. WELDEN, B. L. TRIVEDI,
W. H. DAUGHADAY
Radioreceptor - inactive growth hormone associated
with stimulated secretion in normal subjects
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 471 (1975)

88. SPARK R. F., G. DICKSTEIN, J. PALLOTTA
Complete remission of acromegaly with medical
treatment
JAMA 6, 241 (1979)
89. STEINER D. F., P. OYER
The biosynthesis of insulin and a probable
precursor of insulin by human islet cell adenoma
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 473 (1967)
90. SCHWINN G., H. DIRKS, C. McINTOSH, J. KÖBBERLING
Metabolic and clinical studies on patients with
acromegaly treated with bromocriptine over 22 month
Europ. J. Clin. Invest. 7, 101 (1977)
91. THEORELL J. J., B. G. JOHANSSON
Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}J to
high specific activity
Biochemica et Biophysica Acta 251, 363 (1973)
92. THORNER M. O., A. CHAIT, U. AITKEN, G. BENKER, S. R. BLOOM,
C. H. MORTIMER, P. SANDERS, A. S. MASON, G. M. BESSER
Bromocriptin treatment of acromegaly
Brit. Med. J. 1, 299 (1975)
93. TSUSHIMA T., H. G. FRIESEN
Radioreceptorassay for growth hormone
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 334 (1973)
94. TURKINGTON R. W.
Stimulation of RNA synthesis in isolated mammary
cells by insulin and prolactin bound to sepharose
Biochem. and Biophys. Res. Commun. 41, 1362 (1970)
95. WASS J. A. H., M. O. THORNER, D. V. MORRIS, C. H. REES,
A. S. MASON, A. E. JONES, G. M. BESSER
Longterm treatment of acromegaly with bromocriptine
Brit. Med. J. 1, 875 (1977)
96. WERDER K. von
Wachstumshormon- und Prolaktin-Sekretion des
Menschen
Urban und Schwarzenberg Verlag, München-Berlin-Wien
(1975)

97. WERDER K. von, C. CLEMM
Evidence for "big" and "little" components of
circulating immunoreactive prolactin in humans
FEBS-Letters 47, 181 (1974)
98. WERDER K. von, C. DESALM, S. GALLENBERGER, M. GOTTSMAN,
P. C. SCRIBA
Radioimmunologic behaviour of endogenous and
exogenous human growth hormone
In: Radioimmunoassay and related procedures in
clinical medicine and research, Bd. I, Eds. E. J.
Garcia, E. H. Belcher, IAEA Wien (1974)
99. WERDER K. von, R. FAHLBUSCH, H. K. RJOSK
Hyperprolaktinämie
Internist 18, 520 (1977)
100. WERDER K. von, H. K. RJOSK
Menschliches Prolaktin
Klin. Wochenschr. 57, 1 (1979)
101. WIEDEMANN B.
Radiorezeptorassay für Prolaktin mit Leberzell-
membranen der Ratte
Dissertation an der Med. Klinik Innenstadt der
Universität München (1980)
102. WOLFSEN A. R., H. B. McINTYRE, W. D. ODELL
Adrenocorticotropin measurement by competitive
binding receptor assay
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 684 (1972)
103. WRIGHT D. R., D. A. GOODMAN, K. D. TRIMBLE
Studies on big growth hormone from human plasma
and pituitary
J. Clin. Invest. 54, 1064 (1974)
104. WYK J. J. van, R. L. HINTZ, D. R. CLEMMONS, K. HALL,
K. UTHNE
Human somatomedin, the growth hormone dependent
sulfation and thymidine factor
In: Endocrinology, Ed. R. O. Scow, Excerpta medica,
Amsterdam (1973)

105. YALOW R. S., S. A. BERSON
Radioimmunoassay of human growth hormone in plasma. Principles, practises and techniques
In: Proceedings of I. Internat. Symposium on Growth Hormone, Eds. A. Pecile, E. E. Müller, Amsterdam ICS (1968)
106. YALOW R. S., S. A. BERSON
Further studies on the nature of immunoreactive gastrin in human plasma
Gastroenterology 60, 203 (1971)
107. YALOW R. S., S. A. BERSON
Characteristics of "big ACTH" in human plasma and pituitary extracts
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 415 (1973)

LEBENS LAUF

Ich bin am 9. Oktober 1955 in Amberg/Opf. als Sohn des Oberstaatsanwalts Heinrich Schopohl und seiner Ehefrau Ursula geb. Bartens als sechstes von sieben Kindern geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Nürnberg kam ich 1966 infolge Umzugs meiner Eltern nach Spanien auf das Gymnasium der Deutschen Schule in Bilbao (Spanien), wo ich bis zum Abitur 1974 blieb.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich mit dem Medizinstudium an der Ludwig Maximilians-Universität in München.

Nach dem Physikum im August 1976, dem ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im August 1977 und dem 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im März 1980 beendete ich das Studium im April 1981 mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Die vorliegende Arbeit begann ich im November 1977 in den Labors für Experimentelle Endokrinologie der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München.

